

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE AS
PROPRIEDADES CONTRÁTEIS E A BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL DE CARDIOMIÓCITOS DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Elis Aguiar dos Santos Morra

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória-ES, 17 de dezembro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES**

Nº. Matrícula da Candidata: 2014131661

A comissão julgadora que examinou a tese de doutorado, intitulada "Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre propriedades contráteis e bioenergética mitocondrial de cardiomiócitos de ratas ovariectomizadas", apresentada e defendida publicamente pela aluna Elis Aguiar dos Santos Morra, no dia 17 de dezembro de 2018, às 13 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória-ES, 17 de dezembro de 2018

Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro
Júnior – Orientador (UFES)

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassalo
Membro interno (UFES)

Profª. Drª. Ivanita Stefanon
Co Orientadora (UFES)

Profª. Drª. Silvia Carolina Guatimosim
Fonseca - Membro externo (UFMG)

Prof. Dr. José Geraldo Mill
Membro interno (UFES)

Profª. Drª. Rita de Cassia Aleixo Tostes
Passaglia - Membro externo (USP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 17 de dezembro de 2018

Morra, Elis Aguiar dos Santos, 1982

Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre as propriedades contráteis e a bioenergética mitocondrial de cardiomiócitos de ratas ovariectomizadas. Vitória – 2018.

xxii, 134 p., (UFES, D.Sc., Ciências Fisiológicas, 2018)

Orientador: Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. 1. Treinamento físico. 2. Ovariectomia. 3. Mitocôndrias intermiofibrilares e subsarcolemas.

Dedico este trabalho a minha **Mãe** que me deu a vida e me ensinou o amor; ao meu companheiro **Divo** que me deu significado, aos meus **amigos** que me deram entusiasmo e aos meus bons **professores** que me deram caminhos.

“transformar a experiência educativa em puro treinamento humano é mesquinhar o que há de fundamentalmente humano no exercício educativo: o seu caráter formador”

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

Este espaço é muito especial. Posso aqui revelar todas as forças que permitiram a edificação desta tese. Ao mesmo tempo que é o momento mais prazeroso, é também bastante difícil. É o mais prazeroso porque me permite rememorar os momentos sensíveis e imensuráveis desta etapa. É difícil porque não existem palavras que transfiram para aquele que avistar seu nome na sequência todo o sentimento de gratidão que transporto (e transportarei *ad eternum*).

Agradeço especialmente aos meus orientadores **Rogério Faustino Ribeiro Júnior e Ivanita Stefanon** pelas orientações, oportunidades de trabalho, de estudos e aprendizado. Obrigada por oferecerem todo o suporte intelectual e material demandado, além do carinho, sorrisos, abraços e cafés nestes anos de convivência. **Destaco meu respeito e gratidão. Obrigada Gato Chefe e Chefa Ivalinda.**

Aos colegas do **LEMC** (Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular, pela convivência, trabalhos, seminários, sorrisos e café: Cindy, Diele, Filetti, Gilson, Marito, Maylla, Rebeca, Sabrina, Strela, Tati, Thiago e Vinícius - **Valeu muito!**

Aos colegas do **PPGCF-UFES** Antonio, Marcos, Pollyana, Gustavo, Edgar, Glauci, Phablo, Laís, Ananda, Eduardo Frizera, Eduardo Merlo **pela boa convivência**. Em especial ao Demétrius, Simone e Fabricio, pela parceria e apoio ao longo destes anos.

A todos os **Professores do PPGCF - UFES**, em particular ao **Prof. Mill, Prof. Leonardo dos Santos**, Prof Roger Lyrio e Profª Suely Figueiredo pelas orientações, pelo pensar científico, pelos ensinamentos e boas conversas e aos funcionários **Técnico- Administrativos** Fonseca, Anderson e, em especial, a **doce Cíntia Lírio** por toda ajuda prestada.

Aos laboratórios, aos professores e aos alunos envolvidos na execução deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos das técnicas, pela realização dos experimentos, pela orientação acadêmica e pela forma gentil ao me receber em seus espaços. Ao **Prof. Natali**, aos colegas Miguel, Luiz e Cláudia (Laboratório de Biologia do Exercício - UFV). À **Profª Silvia Guatimosim e ao Itamar** (Laboratório de

Sinalização Intracelular em Cardiomiócitos – ICB/UFMG). Ao **Prof. André Leopoldo** e aos colegas **Jean, Priscila, Andressa e Taynan** (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental – CEFD/UFES). Ao **Prof. Breno Valentim e ao Tadeu** (Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – CCS/UFES). À **Profª Glaucia de Abreu, Simone, Fabrício e Erick** (Laboratório de Regulação Neurohumoral da Circulação). Aos queridos **Bozi e Juliane**. Aos prof. **Viviane e Valério**. Ao Dr. Donald M. **Bers**. À **prof. Suely Figueiredo e ao Gustavo** (Laboratório de Química de proteínas). Às especiais **Renata** (LEMC/UFES) e **Sarinha** (casa, comida e roupa lavada na UFV). **Obrigada!!!!**

À todos os colaboradores do manuscrito pela execução das técnicas, pelas discussões e correções. Muito obrigada!!!

Aos alunos de iniciação científica do CEFD/UFES Leandro, Marcelo, Luan, Mari, Thais, Luiz e Jean pela disponibilidade em ajudar, em especial ao **Jean, pela parceria, amizade e carinho**.

Às **Mitocôndrias Bandidas**: com o nosso malvado favorito Chefe Roger, Paula, Patricia e Karol Ronconi por horas intermináveis de trabalho, de estudo, de centrífuga, de porooooo. **Obrigada por tanta dedicação e carinho**.

Aos membros da Comissão de Ética no Uso de Animais (**CEUA-UFES**) pela **convivência, boas reuniões e aprendizados**, em especial Rodolpho Barros, Roger Lyrio, e Emilly Rossi.

Ao **veterinário Rodolpho** e a sua equipe de biotério por todo trabalho prestado e pela **disponibilidade em ajudar**, sempre.

Aos animais utilizados neste estudo. Mesmo compreendendo a utilização de animais pela ciência, sempe foi desafiador o final de cada protocolo experimental. Deixo aqui um pedido especial: que nunca nos falte ética e respeito à utilização de animais para a pesquisa.

À **FAPES** - Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. Ao **CNPq**_Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e **Capes**_Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio e incentivo à pesquisa.

À minha mãe Mari e ao meu companheiro Divo, por cada dia ao meu lado, por cada lição ensinada, pelo carinho, pelo amor, por me sustentarem quando eu fraquejava, por me tornarem mais pessoa, mais humana, mais completa. Amo vocês!

Aos amigos que a vida me deu e que ao longo dos anos se tornaram a minha família: **família Buscapé, Celina-Suelen-Rodrigo-Celita, Beer&Friends e Meninas da Champa, família Cobre e cia.** Obrigada por tanto **amor e amizade** que não cabem no peito.

Às minhas pequenas, barulhentas, enlouquecidas e **brilhantes crianças** Marina, Luíza, Nadine, Frederico, Luan, Helena (*in memoriam*) e Guilherme por me fazerem sorrir e por me fazerem melhor.

À **Carol**, minha **irmã de vida**, de alma, de cor de rosa, por absolutamente tudo e por todo amor que há nesta vida.

Àquelas que ultrapassaram os limites da Universidade, do doutorado, do LEMC: **Camila, Emilly, Paula e Renata.** Àquelas que dividiriam comigo experimentos, artigos, seminários, aulas, provas, cara emburrada, frustrações, sono, chocolate e lágrimas. Mas também dividiram os sorrisos, os abraços e os cafés mais sinceros e **afetivos que uma amizade precisa ter.** Da Universidade para a vida, porque viver não cabe no *lattes*.

Ao **Erick**, meu grande amigo, parceiro de todas as horas, que tenho total admiração pelo ser humano que é e pelo grande **professor-pesquisador** que se tornou. Obrigada pelas discussões, cafés, estudos, pela ajuda despretenciosa e pelas boas risadas.

Ao prof. **Wellington** Lunz, ou simplesmente ao meu amigo Wellington, por tantos anos de amizade, de carinho, de ensinamentos. Obrigada pela contribuição acadêmico-científica e humana na minha trajetória. Obrigada pela parceria!

Ao meu amigo **Ronald**, o mais marrento do universo por tanto carinho, boas risadas e **discussões fabulosas** sobre esta nada mole vida.

Às primuxas e gateiras mais brilhantes deste universo **Sara e Martinha** pela presença amável e abraços apertados. Aos tios **Teda e Lucinho** pelo apoio, **carinho** e cia de sempre.

À todos os **amigos e familiares** que, embora não mencionados, **me apoiaram**, me fortaleceram e compreenderam minha ausência.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Hormônios sexuais femininos e doenças cardiovasculares	22
1.2 Mitocôndria e disfunção contrátil cardíaca	29
1.3 Adaptações promovidas pelo exercício físico sobre a função contrátil e bioenergética cardíaca	40
1.4 Justificativa.....	47
 2. OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo Geral	50
2.2 Objetivos Específicos	50
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Animais de Experimentação e Manutenção	52
3.2 Ovariectomia	52
3.3 Grupos Experimentais.....	53
3.4 Protocolo de Exercício Físico	54
a) Protocolo de familiarização e adaptação ao treinamento físico.....	54
b) Teste de velocidade máxima de corrida.....	55
3.5 Eutanásia	56
3.6 Análise “ <i>in vitro</i> ” da mecânica miocárdica	57
3.7 Função mitocondrial cardíaca	60
a) Isolamento mitocondrial.....	60
b) Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial - oxidação fosforilativa.....	62
c) Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial	63
3.8 Avaliação do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados.....	64
3.9 Produção mitocondrial de ânion superóxido em cardimiócitos isolados.....	67
3.10 Ensaio de imunofluorescência.....	67
3.11 Análises por microscopia eletrônica de transmissão	68
3.12 Análise da expressão protéica por meio da técnica de <i>Western blotting</i>	69
a) Expressão de proteínas no lisado cardíaco e na mitocôndria	69

b) Detecção de oxidação de proteínas carboniladas	71
3.13 Drogas e reagentes químicos.....	72
3.14 Análise estatística.....	72
4. RESULTADOS	73
4.1 Características gerais e medida da capacidade física	73
4.2 Disfunção da contratilidade miocárdica induzida pela ovariectomia e respostas ao treinamento físico aeróbico	76
4.3 Alterações estruturais em mitocôndrias induzidas pela ovariectomia.....	80
4.4 Treinamento físico aeróbico e fosforilação oxidativa	82
4.5 Treinamento físico aeróbico induz alterações na capacidade de retenção de cálcio mitocondrial	91
4.6 O treinamento físico aeróbico melhora a via de sinalização da biogênese mitocondrial	96
4.7 A ovariectomia aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de ânion superóxido mitocondrial.....	99
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÃO	114
7. REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros ponderais das ratas Sham e ovariectomizadas após 12 semanas de treinamento físico aeróbico74

Tabela 2: Capacidade física de ratas ovariectomizadas após doze semanas de treinamento físico aeróbico75

Tabela 3: Respiração mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons de ratas ovariectomizadas após doze semanas de treinamento físico aeróbico na presença dos substratos energéticos Piruvato + Malato83

Tabela 4: Respiração mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons de ratas ovariectomizadas após doze semanas de treinamento físico aeróbico na presença do substrato energético Succinato85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Efeitos cardioprotetores do estrogênio mediante a ativação de seus receptores	25
Figura 2 Desenho esquemático da mitocôndria	29
Figura 3 Subpopulações mitocondriais em cardiomócitos ventriculares de ratos.....	30
Figura 4 Processos de Fusão e Fissão Mitocondriais	33
Figura 5 Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial	36
Figura 6 Cascata de transcrição da biogênese mitocondrial	39
Figura 7 Cirurgia de castração	53
Figura 8 Divisão dos grupos experimentais.....	53
Figura 9 Esteira motorizada para ratos	54
Figura 10 Esquema representativo do protocolo experimental	56

Figura 11 Esquema representativo do sistema de avaliação da contratilidade de músculo papilar	58
Figura 12 Registro típico da curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+} , mM) obtida em preparação de músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento físico aeróbico	59
Figura 13 Subpopulações mitocondriais subsarcolemal e intermiofibrilar	61
Figura 14 Esquema ilustrativo da mensuração da respiração mitocondrial.....	63
Figura 15 Representação esquemática do isolamento de cardiomiócitos.....	65
Figura 16 Esquema ilustrativo dos principais parâmetros avaliados no transiente de Ca^{2+}	66
Figura 17 Treinamento físico aeróbico melhora disfunção contrátil cardíaca de ratas submetidas a privação dos hormônios sexuais femininos após doze semanas de ovariectomia.....	77
Figura 18 Expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de ratas submetidas a privação dos hormônios sexuais femininos após doze semanas de ovariectomia	78

Figura 19 Área celular de cardiomiócitos de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia	79
Figura 20 Treinamento físico aeróbico restaura as alterações morfológicas mitocondriais de ratas submetidas a privação de hormônios sexuais femininos após doze semanas de ovariectomia.....	81
Figura 21 Respiração mitocondrial das subpopulações isoladas do ventrículo esquerdo na presença dos substratos energéticos Glutamato + Malato.....	86
Figura 22 Respiração mitocondrial das subpopulações isoladas do ventrículo esquerdo com o substrato energético Palmitoil. Avaliação da β -oxidação.....	88
Figura 23 Expressão proteica dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (OXPHOS) das subpopulações mitocondriais isoladas.....	90
Figura 24 Treinamento físico aeróbico restaura a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial induzida pela privação de hormônios sexuais femininos após doze semanas de ovariectomia.....	93
Figura 25 Expressão proteica do canal uniporter mitocondrial (MCU) e Ciclofilina D (CypD) das subpopulações mitocondriais isoladas	95
Figura 26 Treinamento físico aeróbico melhora a bioenergética mitocondrial de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia	98

Figura 27 Treinamento físico aeróbico melhora o estresse oxidativo de cardiomiócitos isolados de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia **100**

Figura 28 Treinamento físico aeróbico melhora o estresse oxidativo de cardiomiócitos isolados de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia **102**

Figura 29 Treinamento físico aeróbico restaura a expressão proteica das enzimas antioxidantes mitocondriais de ratas após doze semanas de ovariectomia **103**

Figura 30 Resumo dos principais achados do estudo **114**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP: Difosfato de adenosina

ADP:O: Razão fosfato inorgânico/oxigênio

AMP: Monofosfato de adenosina

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

ANG II: Angiotensina II

ATP: Trifosfato de adenosina

BSA: Albumina bovina

Ca²⁺: Cálcio

Cu-Zn SOD: Superóxido dismutase Cobre-Zinco

CTE: Cadeia transportadora de elétrons

CyPD: Ciclofilina D

DCV: Doença Cardiovascular

DNAmt: DNA mitocondrial

e⁻: Elétrons

E2: 17β-Estradiol

EF: Exercício Físico

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FAD: Flavina-adenina dinucleotídeo

FADH₂: Flavina-adenina dinucleotídeo reduzida

F/F₀: Transiente de cálcio; variação global de cálcio intracelular

GAPDH: Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase

GPÉR: Receptor de estrogênio acoplado a proteína G

GTP: Guanosina trifosfato

GTPase: Enzimas responsáveis pela hidrólise de GTP

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

i.p: Intraperitoneal

IFM: Subpopulação mitocondrial Intermiofibrilar

IM: Infarto do miocárdio

MCU: Canal mitocondrial uniporter

MFN1: Mitofusina 1

MFN 2: Mitofusina 2

Mn-SOD: Superóxido dismutase manganês

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: Nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NOX-1: Isoforma 1 da NADPH oxidase

NOX-2: Isoforma 2 da NADPH oxidase

NOX-4: Isoforma 4 da NADPH oxidase

NRF1: Fator Nuclear Respiratório

OPA 1: *Optical atrophy 1*

Ovx: Ovariectomia

O₂: Oxigênio

O₂⁻: Ânion superóxido

PC: Peso Corporal

PCor: Peso do coração

PGC1-α: Proteína co ativadora reguladora de transcrição gênica

P_i: Fosfato inorgânico

PKA: Proteína quinase A

PLB: Fosfolambam

PNM: Subpopulação mitocondrial perinuclear

PTPM: Poros de transição de permeabilidade mitocondrial

PU: Peso do útero

PVE: Peso de ventrículo esquerdo

Q: Coenzima Q

RCR: Razão controle respiratório

RS: Retículo sarcoplasmático

SERCA2: Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático

SOD: Superóxido dismutase

SRA: Sistema Renina Angiotensina

SSM: subpopulação mitocondrial subsarcolemal

TF: Treinamento físico aeróbico

TFAM: Fator de transcrição mitocondrial

TTF: Tempo total até a fadiga

T50: Tempo de recaptação de 50% do cálcio

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo Esquerdo

VMC: Velocidade máxima de corrida

VO₂: Consumo máximo de oxigênio

λ_{ex} : Comprimento de onda de excitação

λ_{em} : Comprimento de onda de emissão

Unidades

bpm: Batimento por minuto

°C: Grau(s) Celsius

µm: Micrômetro

µm²: Micrômetro quadrado

nm: Nanômetro

kg: Quilograma

mg: Miligrama

µg: Micrograma

mL: Mililitro

µL: Microlitro

M: Molar

mM: Milimolar

µM: Micromolar

nM: Nanomolar

µmol: Micromole

nmol: Nanomole

pH: Potencial hidrogeniônico

%: Porcentagem

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico (TF) sobre a contratilidade e a função bioenergética mitocondrial cardíaca em ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*) Sham-Ovx, com 10 semanas de idade e divididas aleatoriamente em 4 grupos: Sham, Ovx, ShamEx e OvxEx. O protocolo de treinamento de corrida em esteira foi realizado 5 vezes por semana, com duração de 60 min/dia, por um período de 10 semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, as ratas foram anestesiadas e submetidas a avaliação dos seguintes parâmetros: análise “*in vitro*” da mecânica miocárdica; função e morfologia mitocondrial cardíaca; avaliação do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados; produção mitocondrial de ânion superóxido em cardiomiócitos isolados; expressão de proteínas no lisado cardíaco e na mitocôndria isolada. Os principais resultados mostraram que a Ovx induziu hipertrofia e disfunção cardíaca, diminuindo a expressão da SERCA2 e aumentando a expressão proteica do fosfolambam. O TF restaurou a contratilidade miocárdica, os níveis de SERCA2, aumentou o transiente de cálcio em ratas ovariectomizadas, mas não alterou a expressão da proteína fosfolambam ou a hipertrofia cardíaca. Além disso, a Ovx diminuiu a quantidade de mitocôndrias intermiofibrilares e induziu fragmentação mitocondrial que foi acompanhada por diminuição dos níveis de mitofusina 1, PGC-1 α , NRF-1, AMPK- α total e Tfam mitocondrial. O TF restaurou todas essas alterações, exceto para o mfn1. Essas alterações foram acompanhadas pelo aumento da probabilidade de abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} em ambas as subpopulações. A Ovx também aumentou a expressão da proteína NOX-4 cardíaca, diminuiu a expressão mitocondrial de Mn-SOD, da enzima detoxificante, catalase, e aumentou a carbonilação de proteínas em ambas as subpopulações mitocondriais, que foram prevenidas pelo TF. Em conjunto, nossos resultados mostraram que o treinamento físico aeróbico preveniu a disfunção contrátil e o controle de qualidade mitocondrial cardíaca em ratas com privação hormonal.

Palavras chave: treinamento físico, ovariectomia, mitocôndrias intermiofibrilares e subsarcolemais.

ABSTRACT

We previously demonstrated that the loss of female hormones induces cardiac and mitochondrial dysfunction in the female heart. Here, we show the impact of endurance training for twelve weeks, a nonpharmacological therapy against cardiovascular disease caused by ovariectomy and its contribution to cardiac contractility, mitochondrial quality control, bioenergetics and oxidative damage. We found that ovariectomy induced cardiac hypertrophy and dysfunction by decreasing SERCA2 and increasing phospholamban protein expression. Endurance training restored myocardial contractility, SERCA2 levels, increased calcium transient in ovariectomized rats but did not change phospholamban protein expression or cardiac hypertrophy. Additionally, ovariectomy decreased the amount of intermyofibrillar mitochondria and induced mitochondrial fragmentation that were accompanied by decreased levels of mitofusin 1, PGC-1 α , NRF-1, total AMPK- α and mitochondrial Tfam. Endurance training prevented all these features except for mitofusin 1. Ovariectomy reduced O₂ consumption, elevated O₂⁻ release and increased Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in both mitochondrial subpopulations. Ovariectomy also increased NOX-4 protein expression in the heart, reduced mitochondrial Mn-SOD, catalase protein expression and increased protein carbonylation in both mitochondrial subpopulations, which were prevented by endurance training. Taken together, our findings show that endurance training prevented cardiac contractile dysfunction and mitochondrial quality control in ovariectomized rats.

Keywords: exercise training, ovariectomy, intermyofibrillar and subsarcolemmal mitochondria.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios sexuais femininos e doenças cardiovasculares

A menopausa corresponde ao período fisiológico onde se tem a senescência reprodutiva feminina caracterizada pela redução dos folículos ovarianos ou pela remoção cirúrgica dos ovários (ooforiectomia) e suspensão da menstruação reconhecida retrospectivamente após um ano de amenorréia, sem outra causa patológica ou psicológica [1-3]. A "perimenopausa" ou "climatério" é o período em que surgem as irregularidades menstruais e queixas vasomotoras, que antecedem a menopausa e vão até o primeiro ano seguinte a ela. O termo "transição menopáusica" equivale na prática à perimenopausa [4]. A idade de ocorrência natural da menopausa é, normalmente, a partir dos 50 anos de idade [5]. É acompanhada de importantes alterações fisiológicas, sobretudo hormonais, incluindo o aumento na produção do hormônio folículo estimulante pela hipófise, redução hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais, perda da produção de hormônios ovarianos como estradiol, bem como redução da circulação de andrógenos [6].

Os principais hormônios sexuais femininos são a progesterona e o estrogênio, produzidos principalmente pelos ovários durante a vida reprodutiva. A progesterona (P4) é um hormônio esteroide, lipossolúvel e derivado do colesterol. A partir do colesterol circulante, a P4 é sintetizada no ovário pelo corpo lúteo, placenta e córtex da glândula adrenal. Além dos efeitos hormonais, ela atua como precursora dos estrogênios, androgênios e esteroides do córtex da glândula adrenal. A P4 está associada com o processo da ovulação e o estabelecimento e manutenção da prenhez. Atua com frequência em sinergismo com o estrógeno e exerce várias funções no crescimento das glândulas endometriais e lobuloalveolar da glândula

mamária, na atividade secretora do oviduto e das glândulas endometriais para fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento do zigoto antes da sua implantação, na inibição da contração uterina durante a gestação e na regulação da secreção de gonadotrofinas [7]. Por sua vez, o estrogênio é um termo usado para um grupo de hormônios esteroides com 18 carbonos, que são secretados principalmente pelo ovário e, em menor quantidade, pelas adrenais. O estrogênio engloba três hormônios esteroides estruturalmente semelhantes: 17β -estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3). Desses, o 17β -estradiol é o principal esteroide em humanos que possui propriedades estrogênicas [8]. Assim, a diminuição das concentrações de estrógenos, principalmente o E2, que é a forma mais predominante durante a fase reprodutiva, está associada a uma grande variedade de efeitos adversos a saúde.

O E2 é uma molécula de sinalização sistêmica que utiliza um conjunto de receptores e vias de sinalização para ativar e regular respostas moleculares e genômicas necessárias para a função de determinados órgãos. Em humanos, o E2 é produzido pelos ovários e glândulas adrenais e, na circulação, atua na maior parte dos órgãos e tecidos, incluindo cérebro, sistema cardiovascular (coração e vasos sanguíneos) [9], imunológico, reprodutivo, muscular e ósseo [10]. Os receptores de estrógenos podem ser receptores nucleares (ERs) ou de membranas (mERs). Existem duas isoformas clássicas de ERs, o $ER\alpha$ e $ER\beta$, que diferem em função e localização [11]. Além dos receptores estrogênicos que medeiam as ações clássicas, ou seja, a ligação do estrogênio aos receptores intracelulares alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$), um terceiro receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) tem sido apontado como um dos responsáveis pela via de sinalização intracelular que medeia efeitos agudos (extra nucleares) do estrogênio. Este receptor pertence à família dos receptores acoplados à proteína G [12]. A sinalização clássica do E2 ocorre resultante

da translocação do ER para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta do estrógeno para regular a expressão gênica. Trabalhos recentes estabelecem a presença de receptores de estrógeno na mitocôndria, sendo o mais abundante o ER β [13-15].

A depleção dos hormônios esteróides sexuais é uma consequência fisiológica do envelhecimento, podendo potencializar o aumento da vulnerabilidade a doenças em tecidos hormônio-responsivos como o cérebro, músculo, ossos e sistema cardiovascular [5, 9]. Os desfechos mais comumente observados no período pós-menopausa são, osteoporose, câncer de mama e doenças cerebrovasculares, estando associados a altos índices de morbidade e mortalidade nesta população [16, 17]. Além das alterações na função metabólica como redução da tolerância à glicose e alteração no perfil lipídico, bem como nas doenças cardiovasculares, como aumento da pressão arterial, disfunção endotelial e inflamação vascular [9, 18].

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem-se entre as principais causas de morte independente do sexo, e representam aproximadamente 17,3 milhões de mortes por ano em todo mundo. Estima-se que este número aumente para além de 23,6 milhões no ano de 2030 [19]. Entre as mulheres, as DCVs são as principais responsáveis pelas mortes deste grupo, sobretudo naquelas acima de 50 anos de idade [5]. Dados epidemiológicos mostram que as mortes por DCV, principalmente após o climatério, assumem índices em torno de 53% excedendo, inclusive, aquelas causadas por todos os tipos de câncer [20].

A expectativa média de vida das mulheres é relativamente maior quando comparada a média masculina [21] e o risco de desenvolvimento de DCV aumenta simultaneamente ao avanço da idade no período pós-menopausa, quando comparado ao período pré-menopausa [22], cuja incidência de DCV é menor, exibindo assim, uma

cardioproteção quando comparado aos homens de mesma idade. Contudo, esta proteção é gradualmente perdida após a menopausa, igualando ou inclusive excedendo os riscos observados nos homens [21, 23]. Acredita-se que essa diferença entre os períodos pré e pós-menopausa esteja associado principalmente aos efeitos cardioprotetores do estrogênio (Figura 1).

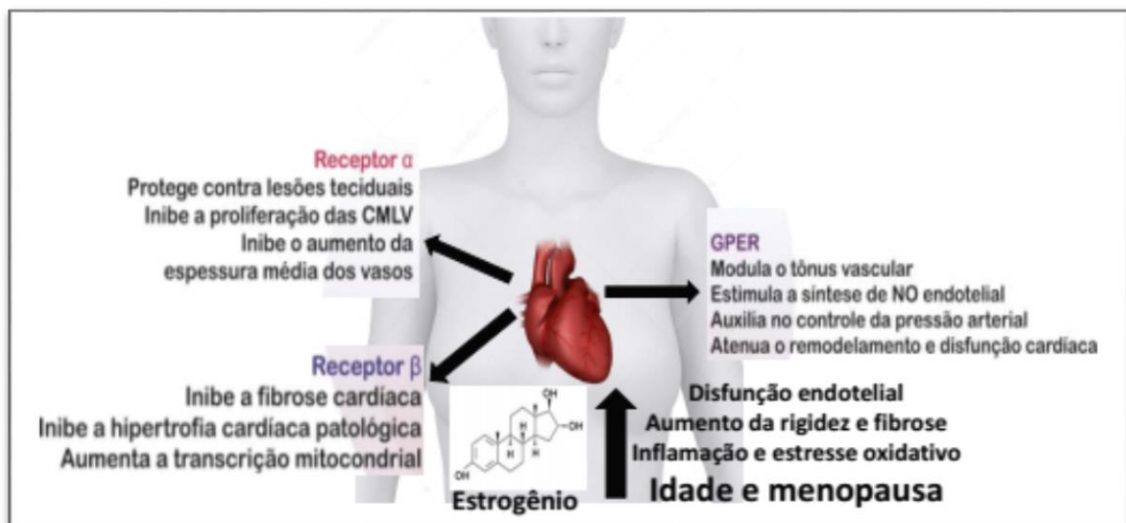


Figura 1: Efeitos cardioprotetores do estrogênio mediante a ativação de seus receptores. GPER, Receptor de estrogênio acoplado a proteína G. CMLV, Células do Músculo Liso Vascular. NO, Óxido Nítrico.

Dentre todos os eventos envolvidos no desenvolvimento das DCVs, o infarto do miocárdio (IM) é o desfecho clínico mais prevalente no mundo, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade. Segundo a *American Heart Association* (2015), o número de mulheres americanas diagnosticadas com IM ou doença arterial coronariana fatal é de 35 por 1000, entre as mulheres com idade na faixa etária de 45 à 54 anos; 60 por 1000 entre as com idade de 55 à 64 anos; e 70 por 1000, na idade de 65 à 74 anos, indicando que a prevalência de IM aumenta a partir da idade de início da transição para o período da menopausa, e cresce consideravelmente nos anos subsequentes. No Brasil, segundo Guimarães, Avezum, Piegas (2006) entre os anos

de 1996 e 2003, 532.923 mortes associadas ao IM e, um aumento considerável de 61% no número de internações foram notificadas. Tem sido demonstrado que, de forma geral, as mulheres sofrem o primeiro IM cerca de 6-10 anos mais tarde comparado ao homem, atribuindo-se esta diferença aos efeitos protetores do estrogênio, exercendo um potencial benefício na progressão da doença cardíaca [24, 25], contribuindo, reconhecidamente, para melhora de fatores ligados a um melhor perfil aterogênico, como a redução de lipídeos circulantes, de moléculas pró-inflamatórias, aumento da produção endotelial de óxido nítrico, além de efeitos antioxidantes [26].

Foi evidenciado que mulheres que são submetidas a cirurgia de histerectomia ou a ooforiectomia bilateral antes da menopausa, estão sujeitas a um risco excessivo para o acometimento pelo IM [27]. Além disso, mulheres que são afetadas por doença cardíaca isquêmica após a menopausa, geralmente exibem um prognóstico piorado quando comparadas aos homens [25].

Resultados de estudos experimentais de nosso grupo de pesquisa, indicam que a deficiência estrogênica está fortemente associada a redução da força contrátil, com agravos ao mecanismo acoplamento-excitação-contração [28, 29]. Dessa forma, foi demonstrado em experimentos com músculo papilar isolado em ratas submetidas a cirurgia de ovariectomia, redução da força contrátil após estimulação com cálcio e com agonista β - adrenérgico (isoproterenol), sendo esses efeitos dependentes da ativação do receptor AT-1 (AT-1R) [28, 30]. O sistema renina angiotensina (SRA) desempenha um papel importante sobre a regulação cardiovascular, principalmente através da Ang-II [31]. Dessa forma, além dos efeitos sobre a função contrátil, a Ang-II também está associada ao aumento na produção das EROs, com aumento na atividade e expressão da NADPH oxidase e a alterações na expressão das proteínas

responsáveis pela cinética de cálcio [31, 32], como diminuição da expressão proteica e da função da SERCA2, diminuindo a ativação da responsividade do miofilamento ao Ca^{2+} e aumentando a expressão do fosfolambam [29, 33, 34]. Paigel et al.(2011) [29], demonstraram que esses efeitos são tempo-dependentes, ou seja, ocorrem em função do tempo em que os animais ficam privados da exposição ao E2, sendo a disfunção contrátil observada com cerca de 60 dias após a ovariectomia, é restaurada com a reposição de E2. Turdi et al. (2015) [35], em estudo semelhante, observaram em cardiomiócitos isolados de camundongos que a deficiência de E2 reduz o pico e a velocidade de encurtamento e relaxamento das células cardíacas, efeitos que foram atenuados pela terapia com E2 mediante a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK).

Portanto, de acordo com os resultados dos estudos expostos acima, podemos verificar que a deficiência de E2 é um fator de grande importância para a redução da função contrátil das células cardíacas, e que explica, parcialmente, o aumento do risco cardiovascular com a ausência dos hormônios ovarianos.

No intuito de compreender os mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas associadas a privação dos hormônios sexuais femininos e estabelecer estratégias não farmacológicas para prevenir/atenuar essas alterações, utiliza-se experimentalmente a remoção bilateral do ovários por uma técnica chamada ovariectomia (Ovx) [36]. Esta técnica permite estudar os efeitos da redução dos estrógenos e possíveis intervenções sobre os vários tecidos, como muscular esquelético, cardíaco e renal. Já está bem estabelecido que a Ovx em roedores produz aumento da massa corporal total, alterações na composição corporal e no perfil lipídico, maior deposição de gordura em diversos tecidos (músculo, fígado,

coração), redução da musculatura esquelética (sarcopenia) e da massa mineral óssea (osteopenia), e aumento de marcadores inflamatórios [37, 38].

Nesse contexto, podemos destacar que um número substancial de vias de sinalização é regulado pelo estrogênio com ação sobre a função mitocondrial [39]. As mitocôndrias, por sua vez, desempenham um papel central na integração de uma gama de ações de sinalização celular, como modulação do suprimento energético, sinalização das espécies reativas de oxigênio e das vias intrínsecas de apoptose [40]. As alterações na biogênese e função mitocondrial podem constituir-se um foco central no desenvolvimento das DVCs, associadas ao processo de envelhecimento fisiológico celular, como a menopausa [41, 42]. Assim, falhas no metabolismo mitocondrial podem estar associadas à disfunção e morte celular por causas diversas, incluindo doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e neurodegenerativas [43].

No estudo de Colom et al. (2007) [44], os autores observaram que as mitocôndrias do músculo cardíaco de fêmeas apresentavam diferenças funcionais em relação aos machos, fato que está ligado a uma cadeia de transporte de elétrons mitocondrial mais eficiente e a uma menor geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O comprometimento da função mitocondrial induzido pela ovariectomia levou a uma maior produção de H_2O_2 , que, juntamente com a aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), poderia contribuir para o aumento do dano oxidativo protéico observado em animais Ovx. Além disso, este grupo apresentou maior produção de EROs por moles de O_2 consumido, sugerindo uma diminuição na eficiência da CTE. Estes resultados apontam para a ideia de que a privação dos hormônios ovarianos aumenta o estresse oxidativo cardíaco devido a um desequilíbrio das defesas antioxidantes, que não conseguem contrabalancear a maior produção de EROs [44].

1.2 Mitocôndria e disfunção contrátil cardíaca

A mitocôndria é uma organela de membrana dupla, uma externa e outra interna, um estreito espaço intermembranar e uma ampla matriz (Figura 2). Devido a sua localização nos músculos, as mitocôndrias são classificadas em 3 subpopulações (Figura 3). A subpopulação intermiofibrilar (IFM), firmemente inserida entre miofilamentos, presente em toda extensão dos sarcômeros entre as linhas Z e entre as junções do retículo sarcoplasmático. São organizadas longitudinalmente com forma alongada e tamanho entre 1,5 a 2 μm . A subpopulação subsarcolemal (SSM), facilmente identificada nas fibras musculares localizada logo abaixo do sarcolema e de até 4 μm de tamanho. Se organiza aleatoriamente e apresenta forma oval, esférica e poligonal. O terceiro tipo de subpopulação, a perinuclear (PNMs), apresenta tamanho menor e forma arredondada em relação à IFM) [45-47].

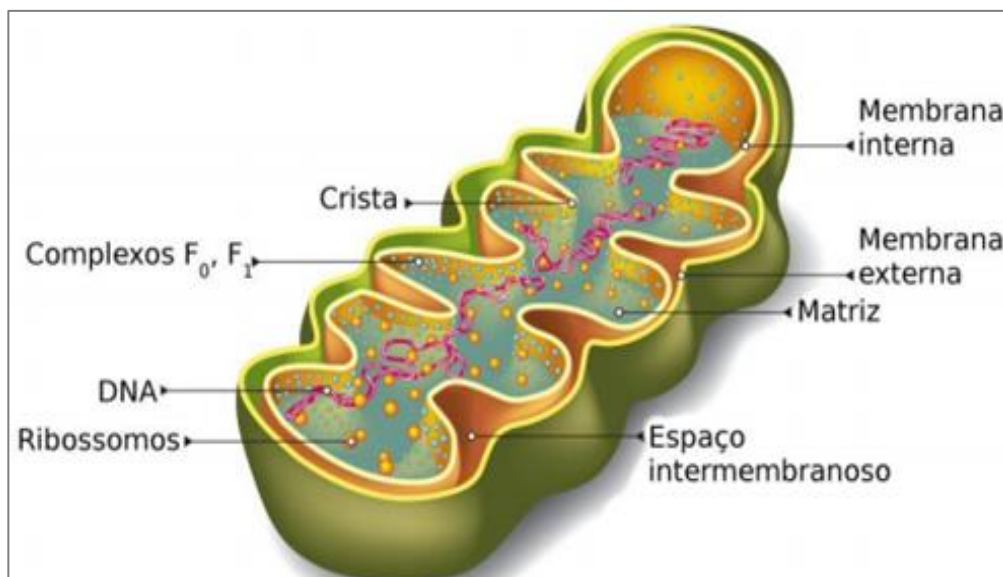


Figura 2. Desenho esquemático da mitocôndria.

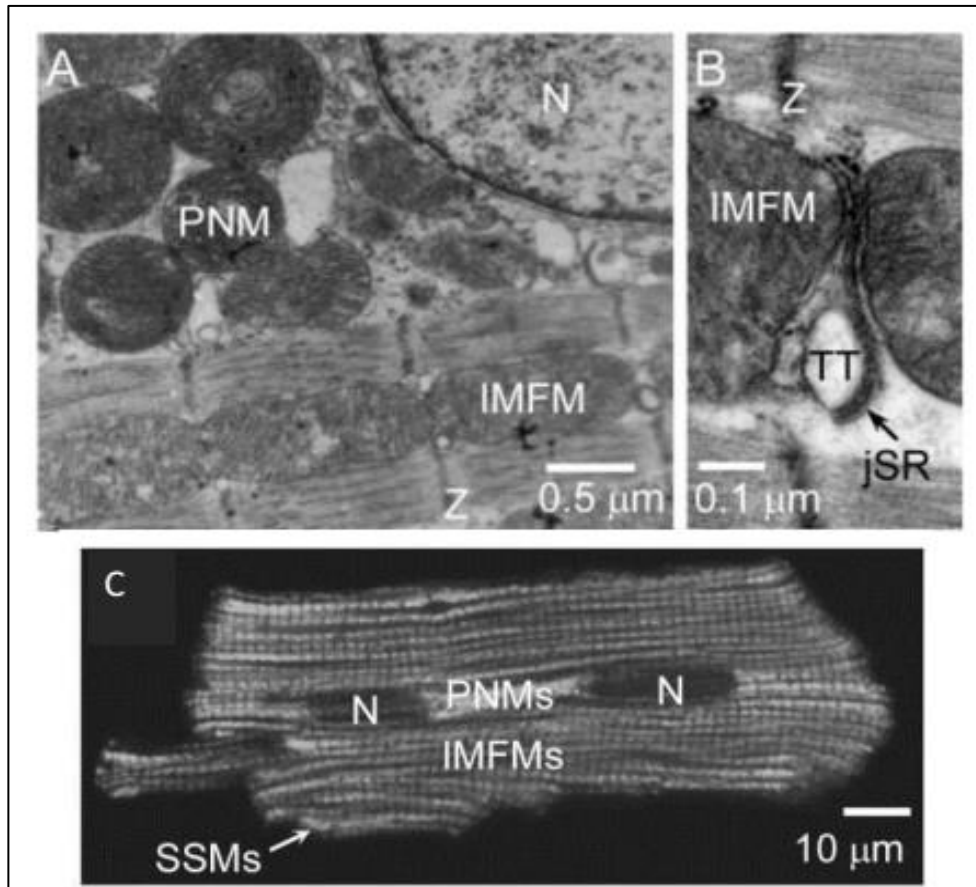


Figura 3. Subpopulações de mitocôndrias em cardiomiócitos ventriculares de ratos. Microfotografia eletrônica; Seção ultradelgada longitudinal, fixação convencional. Secção ultrafina longitudinal. (A) Mitocôndrias perinucleares (PNM) e intermiofibrilares (IMFM). (B) Mitocôndrias intermiofibrilares (C) mitocôndrias subsarcolemal (SSMs) (LUKYANEKO, CHIKANDO E LEDERER, 2009) [47].

Um estudo relativamente recente, ao investigar as diferenças moleculares de mitocôndrias SSM e IFM isoladas de corações de animais sedentários, por meio de ensaio proteômico, mostrou que há aproximadamente 12 proteínas diferencialmente expressas entre essas subpopulações. Nesse sentido, três proteínas envolvidas na cadeia respiratória mitocondrial foram encontradas em menor abundância nas mitocôndrias SSM em comparação as IFM [48], o que é consistente com a observação de que as mitocôndrias SSM exibem taxas mais baixas de fosforilação oxidativa em comparação com as mitocôndrias do IFM [45, 49].

A principal função bioquímica da mitocôndria é a produção de energia para a contração celular na forma de ATP, através do processo da fosforilação oxidativa, sendo auxiliado pelo Ciclo de Krebs e pelo processo de beta-oxidação [50], além de seu envolvimento na ativação de vias de sinalização pró-apoptóticas [51]. Além destes achados, novos estudos foram conduzidos a fim de se caracterizar a dinâmica mitocondrial, identificando mudanças não só na morfologia quanto no rearranjo estrutural frente a diferentes estímulos indicando o envolvimento de genes relacionados a esta plasticidade mitocondrial [52, 53].

Estes estudos foram pioneiros ao evidenciar a importância desta plasticidade na dinâmica mitocondrial, caracterizada pela movimentação intracelular e regulação de sua arquitetura e, na manutenção da função celular [54]. O envolvimento da dinâmica mitocondrial com diferentes processos fisiológicos como metabolismo oxidativo, apoptose, autofagia e ciclo celular [55, 56] ocorre em resposta a sinais intra ou extracelulares; às oscilações nas demandas metabólicas, que acabam por modificar a forma, o número e a distribuição da organela para que esta se adapte as necessidades funcionais e energéticas da célula; e às necessidades de manutenção e eliminação do material genético mitocondrial e degradação da organela [52, 57].

A dinâmica mitocondrial é diretamente mediada pelos processos de fusão e fissão mitocondriais (Figura 4). A fusão mitocondrial caracteriza-se pela união de duas ou mais mitocôndrias, permitindo a troca de DNA e proteínas mitocondriais, com a finalidade de reparar a função mitocondrial ao promover a dispersão das mutações e enzimas senescentes por toda a rede [55]. É regulada pela ação de duas classes de GTPases: mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e *optical atrophy 1* (OPA1). Estas proteínas são ativadas pela hidrólise de GTP (guanosina trifosfato). No processo de fusão, as membranas, externa e interna, se fundem em eventos separados. As mitofusinas,

ancoradas na membrana externa da mitocôndria, são responsáveis pela fusão das mesmas, enquanto que a OPA1, presente na membrana interna atua fundindo as membranas internas das duas organelas [55]. Entretanto, o mecanismo e os fatores que sinalizam uma região específica da organela para que se inicie todo esse processo ainda não está bem esclarecido (Figura 4).

Diferente da fusão mitocondrial, o processo de fissão, caracteriza-se pela divisão de uma mitocôndria em duas ou mais novas organelas. Esta ação, restaura a morfologia da organela e contribui para a manutenção da viabilidade celular [55]. Este processo facilita o transporte da organela dentro da célula, para regiões com maior demanda energética ou, para o direcionamento para a degradação lisossomal, por exemplo [58, 59] (Figura 4). As principais proteínas que participam do processo de fissão mitocondrial são: *dynamamin-related protein 1* (Drp1) e *fission 1 homologue protein* (Fis1). A Drp1 está localizada principalmente no citosol e atua sob a hidrólise de GTP. Durante o processo de fissão, a Drp1 transloca-se do citosol para a membrana externa da mitocôndria e liga-se à proteína Fis1. Este processo parece ser responsável pela fissão da membrana externa mitocondrial [60], ao passo que os mecanismos que atuam na fissão da membrana interna ainda não foram totalmente elucidados (Figura 4).

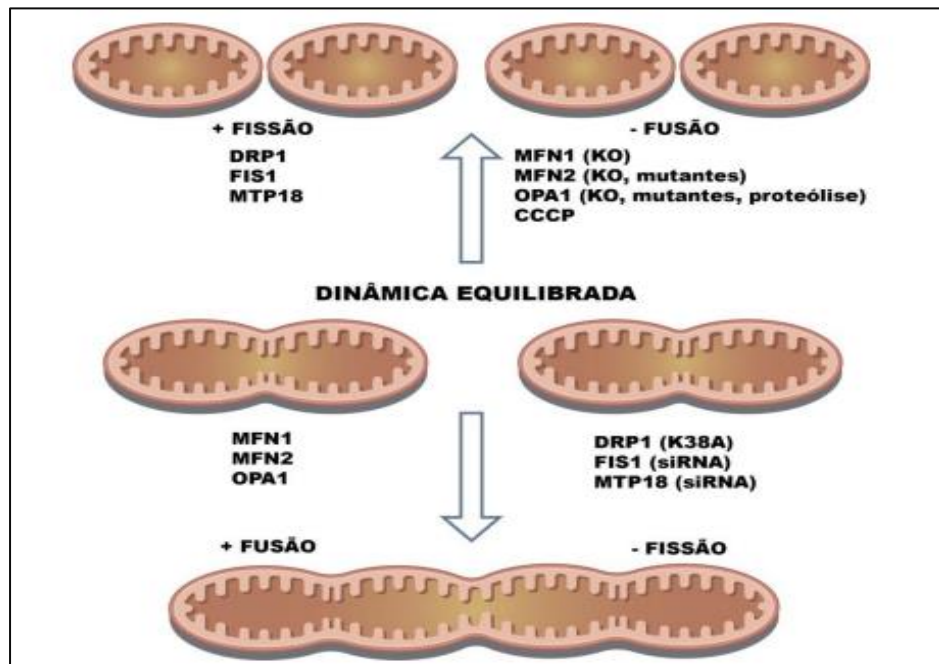


Figura 4. Processos de Fusão e Fissão Mitocondriais. Drp1 – *dynammin-related protein 1*; Fis1 – *fission 1 homologue protein*; Mfn1–mitofusina 1; Mfn2 – mitofusina 2 e OPA1 – *optical atrophy 1* (Adaptado de LIESA, PALACIN E ZORZANO, 2009) [55].

Além do papel central da mitocôndria como a principal fonte de produção de energia por meio da respiração nos seres eucariotos, esta organela tem um papel-chave na sinalização celular e na regulação direta de processos como apoptose, diferenciação, crescimento e proliferação celular.

As mitocôndrias ocupam cerca de 30% do volume total e o metabolismo mitocondrial é a principal fonte de energia no cardiomiócito adulto [61-63]. Aproximadamente 95% da formação de ATP mitocondrial cardíaco é oriundo da fosforilação oxidativa de ácidos graxos, ficando o 5% restantes derivados da glicólise e no GTP formado no ciclo do ácido cítrico. O coração tem uma concentração de ATP relativamente baixa (em torno de 1mM) e uma alta taxa de hidrólise de ATP, portanto, em condições normais, o pool de ATP no miocárdio se renova a cada 10 segundos, aproximadamente. Além disso, cerca de 60-70% da hidrólise de ATP é utilizada na

maquinaria contrátil e os restantes 30-40% são usados principalmente pelo retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase e outras bombas de íons. No coração saudável, a taxa de fosforilação oxidativa é exclusivamente ligada à taxa de hidrólise de ATP, de modo que o conteúdo de ATP permanece constante mesmo com grandes aumentos na demanda cardíaca [64].

Dentre as funções metabólicas que ocorrem na matriz mitocondrial se destaca a síntese de ATP por meio do acoplamento da fosforilação oxidativa com a cadeia de transporte de elétrons e o ciclo de Krebs, sistema de enzimas responsável pela oxidação de carboidratos, gorduras e outros substratos que gera energia armazenada na forma de elétrons provenientes da dissociação dos átomos de hidrogênio em prótons e elétrons, que foram transferidos para o O_2 através de uma série de complexos proteicos (complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase). O gradiente eletroquímico de prótons gerado durante o transporte de elétrons é utilizado para impulsionar a conversão de ADP (adenosina difosfato) + P_i (fosfato inorgânico) em ATP, por meio do complexo ATP sintase [50] (Figura 5). Cabe destacar que o piruvato (produto da glicólise), glutamato, malato e palmitoil-carnitina, são degradados no ciclo de Krebs para redução do NAD^+ em NADH (nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida) e o succinato que reduz o FAD em FADH_2 . Além disso, a oxidação de ácidos graxos contribui para alimentar o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória por meio da acetil-CoA e através da formação do NADH e FADH_2 [65] (Figura 5).

De forma simplificada, durante o Ciclo de Krebs, os elétrons são doados para carreadores específicos, NAD^+ (nicotinamida adenina nucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo), formando NADH e FADH_2 , respectivamente. Os elétrons provenientes de NADH são transferidos para o complexo I, que na sequência é

oxidado, promovendo a redução da coenzima Q. Já os elétrons de FADH₂ são transferidos via complexo II direto para a coenzima Q reduzida. Os elétrons da coenzima Q são transferidos para o complexo III que reduz o citocromo c, uma proteína periférica de membrana. Finalmente, o citocromo c reduz o complexo IV que irá transferir elétrons para o O₂, acceptor final da CTE. A passagem de elétrons por estes carreadores acompanha uma liberação de prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria, gerando um gradiente eletroquímico que favorece a reentrada de prótons por meio da ATP sintase, esta por sua vez utiliza a energia próton-motriz para fosforilar ADP, gerando ATP. A força próton-motriz é também utilizada para o transporte de íons fosfato para o interior da organela, além da troca de ATP intramitocondrial por ADP extramitocondrial [50]. Acredita-se que as duas subpopulações mitocondriais, IFM e SSM, geram ATP para diferentes funções. Pela íntima localização com o sarcolema entende-se que a SSM gera ATP para o transporte ativo da membrana e a IFM para a contração das miofibrilas, visto que estas se localizam entre as miofibrilas [46].

Os elétrons transportados pela CTE nem sempre chegam ao seu acceptor final, o O₂ complexado à citocromo c oxidase (complexo IV). Em determinadas situações que provoquem aumento no consumo de O₂ e/ou no fluxo de elétrons pela CTE [66], e/ou no potencial de membrana interna mitocondrial [67] geram extravasamento de elétrons entre os complexos I e III. Neste processo, ocorre a formação de EROs, pois ao invés dos elétrons serem doados para o próximo componente da cadeia e chegar ao seu acceptor final, são doados para o O₂, formando o ânion superóxido (O₂⁻), um radical livre capaz de causar dano oxidativo em diversos componentes mitocondriais e celulares. Como bem conhecido, tal regulação está intimamente relacionada ao fato

da mitocôndria ser a maior fonte intracelular de EROs, geradas em sua maioria pelos complexos I e III da CTE (Figura 5).

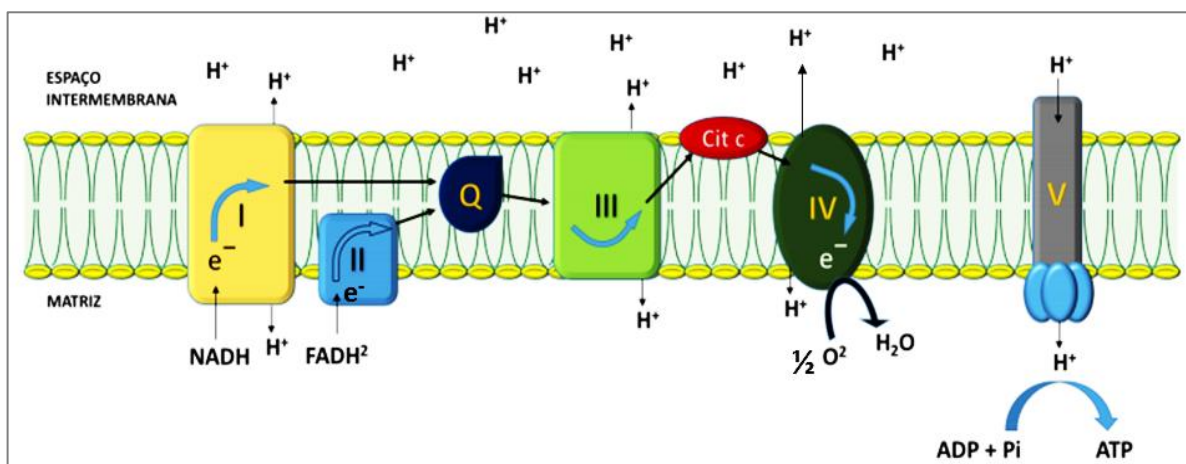


Figura 5. Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase; e^- -elétrons; H^+ - íons hidrogênio; NADH – nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida; Q – coenzima Q; Cit c – citocromo c (Adaptado de Tahara et al., 2009).

A produção exacerbada de EROs, bem como sua alta toxicidade, podem inativar diretamente proteínas mitocondriais ou contribuir para a oxidação de lipídeos e carboidratos, gerando uma disfunção mitocondrial [68]. Esta disfunção é atenuada devido à presença de defesas antioxidantes na matriz mitocondrial [69]. Vale salientar que, níveis moderados de EROs são determinantes para o funcionamento celular adequado, visto que atuam como segundos-mensageiros em diversos processos celulares [70].

São várias as vias formadoras de EROs no sistema cardiovascular, destacando-se entre elas o sistema da NADPH oxidase, que é estabelecida como a principal fonte de superóxido no coração [71], e que está envolvida com o aumento do estresse oxidativo em diversas doenças cardiovasculares, incluindo o IM e a insuficiência cardíaca [72, 73]. Em estudo recente, Claudio et al. (2017) [73],

observaram um aumento significativo do estresse oxidativo no coração de animais submetidos a Ovx.

Além de participar dos processos de produção de energia e de EROs, a mitocôndria está intimamente relacionada aos eventos de envelhecimento e morte celular. O controle da homeostase do Ca^{2+} cardíaco, por exemplo, se dá principalmente, pela ação conjunta dessa organela e do RS. A proximidade entre estas estruturas facilita a troca do Ca^{2+} e permite a manutenção dos níveis fisiológicos do íon, contribuindo diretamente para a contração cardíaca. Em condições normais, a força eletroquímica decorrente do potencial de membrana interna mitocondrial permite a entrada de Ca^{2+} através de transportadores/trocadores específicos, e o balanço influxo/efluxo do íon é mantido [74]. Entretanto, elevações nas concentrações de Ca^{2+} , causam modificações no interior da organela e resultam na diminuição do potencial de membrana mitocondrial, na formação e ativação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), levando à ruptura da organela [75], culminando na liberação de importantes proteínas pró apoptóticas para o citosol, como o citocromo c [76]. Em algumas DCVs, esse desajuste funcional contribui para a progressão da doença, estando diretamente relacionada à morte celular [77, 78].

Estudos clínicos e experimentais tem demonstrado que na DCV ocorre diminuição na eficiência respiratória mitocondrial cardíaca, com redução na atividade dos complexos da CTE, fator determinante para o prejuízo na transferência de energia para a contração cardíaca e consequente progressão da disfunção ventricular [79, 80]. No entanto, a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial não depende, apenas, da atividade individual dos complexos respiratórios, mas também do ajuste entre os componentes da CTE, gerando unidades funcionais. Desajustes dessas unidades, assim como mudanças na biogênese/morfologia mitocondrial e um remodelamento

metabólico da organela que acompanha o desenvolvimento da disfunção cardíaca, podem exercer um importante papel fisiopatológico nas DCVs [81, 82].

Quando a disfunção da cadeia respiratória gera deficiência de ATP, isto pode estimular a biogênese mitocondrial através da ativação destes genes nucleares de replicação e transcrição mitocondriais na tentativa de balancear falhas na fosforilação oxidativa. A biogênese mitocondrial ocorre através da ativação do coativador 1 α do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxisoma, o PGC-1 α . O PGC-1 α é uma proteína reguladora de uma variedade de processos metabólicos, incluindo a formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos e no coração, bem como no controle da β -oxidação mitocondrial [83, 84], e também controla a resposta celular ao estresse oxidativo [85]. Na biogênese mitocondrial, o PGC-1 α interage com fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), os quais são conhecidos reguladores do processo de transcrição e replicação mitocondrial. Com maior importância, o NRF-1 que ativa, entre outras enzimas, o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), que é um potente estimulador da duplicação do DNA mitocondrial. A ativação de Tfam também foi descrita através da fosforilação de NRF-1, levando a um aumento no conteúdo de DNA mitocondrial (DNAm) [86, 87].

O trabalho de Choi et al. (2001) [88] mostra que os níveis de Tfam são proporcionais ao do DNAm. Estudos com células HeLa mostram que redução na expressão do Tfam está associada à diminuição da replicação do DNA mitocondrial. Portanto, o aumento na expressão do Tfam preveniria desordens relacionadas à redução da expressão proteica desse fator, além de resultar em aumento na biogênese mitocondrial [89]. Todas as proteínas que regulam a transcrição e replicação do DNA mitocondrial são codificadoras nucleares e requerem entrada na organela. Provavelmente a mais importante dessas proteínas a serem transportadas

é o Tfam. A entrada das proteínas para a mitocôndria é um processo complexo que envolve transportadores de proteínas que ficam em compartimentos submitocondriais. Na matriz mitocondrial, o Tfam leva a um aumento no número de cópias do DNA presente na célula e à replicação da mitocôndria [87, 90]. A figura 6 mostra de forma esquemática a via simplificada da biogênese mitocondrial.

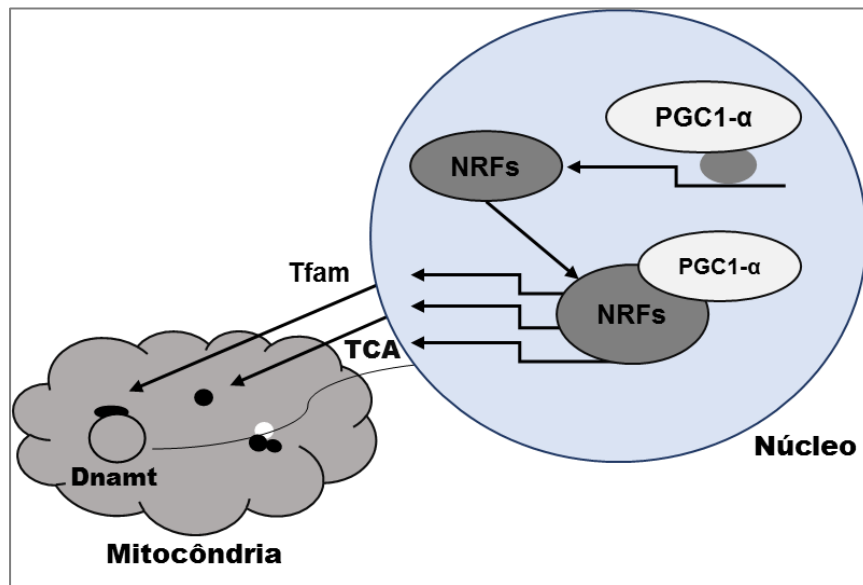


Figura 6. Cascata de transcrição da biogênese mitocondrial. O co-ativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1) ativa a transcrição e a atividade transcrricional dos fatores respiratórios nucleares (NRFs). Os NRF ativam a transcrição do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) e os genes que codificam as proteínas da cadeia respiratória de elétrons (CTE) e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), levando à ativação de sistemas dos genomas nucleares e mitocondriais. Tfam ativa a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (DNamt)

O processo de biogênese mitocondrial refere-se não apenas à formação de novas mitocôndrias, mas também ao processo de aumento da organela e da expressão de enzimas relacionadas à sua função. É um processo complexo, uma vez que a mitocôndria é derivada de genomas nucleares e mitocondriais [90]. Diferentes estímulos, como a ativação simpática, o exercício físico, a queda da temperatura corporal, as espécies reativas de oxigênio, dentre outros, podem ativar a biogênese

mitocondrial [70, 90, 92, 93]. Nos últimos anos, intervenções não farmacológicas que modulam o *turnover* mitocondrial, como o exercício físico, vem sendo estudadas como um meio para melhorar o controle de qualidade mitocondrial, reverter a disfunção cardiovascular e aumentar a longevidade [59, 94].

1.3 Adaptações promovidas pelo exercício físico sobre a função contrátil e bioenergética cardíaca

Em contrapartida à toda essa cascata de eventos que tanto predispõe ao risco para DCV, a partir da década de 1970 o efeito do exercício físico (EF) nas DCVs começou a despertar interesse. Dentre os principais benefícios do EF, destacam-se: redução da hiperatividade nervosa simpática, melhora na função ventricular esquerda, remodelamento cardíaco, aumento na tolerância aos esforços físicos e melhora no metabolismo muscular esquelético [95-97]; além das diversas adaptações bioquímicas e moleculares no músculo cardíaco [48, 98]. Nesse sentido, a mortalidade por todas as causas são atrasadas pela mudança de um estilo de vida sedentário, ou insuficientemente ativos, para aquele que atinge os níveis mínimos de recomendação, reduzindo o risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico, diabetes do tipo 2, além de algumas formas de câncer, como o de cólon e o de mama [99]. Assim, a aquisição de um estilo de vida saudável passa a ser considerada como elemento chave nas estratégias de prevenção primária e secundária à saúde.

Campbell et al. (2010) [100], avaliaram os efeitos de um programa de treinamento físico aeróbico (TF) de um ano em 173 mulheres sedentárias com sobrepeso e obesidade, no período pós-menopausa; e verificaram uma redução de um biomarcador de peroxidação lipídica (F2-isoprostanos), associados a ganhos

marcantes na capacidade física aeróbica, mesmo com mudanças mínimas sobre a composição corporal. Pialoux et al. (2009) [101] demonstraram que, após a menopausa, o nível de condicionamento físico e atividade física regular são importantes ferramentas contra o estresse oxidativo, mantendo a eficiência de enzimas antioxidantes no plasma.

Estudos têm mostrado evidências de que efeitos benéficos do TF na dinâmica do Ca^{2+} dos cardiomiócitos estão associados a alterações na duração do potencial de ação e redução na produção de EROs [102, 103]. Além disso, é possível que o efeito cardioprotetor do exercício físico ocorra em resposta a adaptações no metabolismo energético miocárdico. É bem aceito que o treinamento físico aumente as taxas cardíacas de oxidação de ácidos graxos, especialmente através do aumento da atividade miocárdica da carnitina palmitoil transferase (CPT-1) [104, 105]. Esta adaptação impede o acúmulo de ácidos graxos nas células cardíacas limitando seus efeitos citotóxicos, como o aumento da produção de EROs, melhorando a função cardíaca [104, 105].

Durante e após o TF, vários mecanismos estão ativados em diferentes órgãos e sistemas na tentativa de promover a manutenção/restauração da homeostase celular. Modificações na concentração intracelular de ATP, reduções no estoque de glicogênio, mudanças na temperatura e pH, perda da homeostase do Ca^{2+} e desacoplamento na respiração mitocondrial desencadeiam a formação de EROs [106]. O metabolismo cardíaco aumenta significativamente quando comparado à condição de repouso, resultando no aumento do consumo de O_2 e promovendo uma série de adaptações mitocondriais para tornar eficiente o funcionamento do coração [48]; como o aumento da atividade dos complexos respiratórios I, III e IV da CTE e, consequente redução na produção de EROs [107, 108].

Além dessas alterações para a manutenção do estado redox, a integridade da membrana mitocondrial é essencial para a função de fosforilação oxidativa. Qualquer ruptura desta membrana afeta a capacidade respiratória celular. Resultados conflitantes foram relatados na função mitocondrial de ratos correndo até a exaustão. Enquanto alguns autores não relataram alterações na respiração mitocondrial [109, 110], outros relataram um decréscimo no consumo de oxigênio após um exercício similar [111]. Assim, a atividade mitocondrial pode ser afetada pelo exercício de acordo com sua intensidade. Portanto, uma possível explicação para os resultados divergentes poderia ser os diferentes protocolos de execução usados.

Embora o TF durante a sua prática induza a produção de EROs, como reposta aguda, o TF ativa o sistema de defesa antioxidante do organismo, o qual é reportado na literatura como sendo um mecanismo de defesa celular em condições de estresse oxidativo. A exemplo disso, a maior parte do ânion superóxido produzido é anulada pela superóxido dismutase manganês, uma enzima especificamente localizada na matriz mitocondrial [112].

Nojiri et al. (2006) demonstraram que camundongos com deleção do gene da SOD no músculo cardíaco desenvolveram uma cardiomiopatia dilatada associada à uma progressiva intolerância aos esforços físicos. Esse quadro veio acompanhado de um aumento na formação de EROs, contribuindo para a redução na produção de ATP por meio da ativação das enzimas desacopladoras mitocondriais [79]. Neste sentido, o TF é tido como uma ferramenta eficiente no combate ao dano oxidativo em diversas DCVs [113, 114].

No estudo conduzido por Irigoyen et al. (2005) [115], os autores observaram aumento do estresse oxidativo nos músculos cardíaco e esquelético de ratas ovariectomizadas, aumento da atividade da SOD no coração e da catalase no

gastrocnêmio de ratas Ovx submetidas a oito semanas de TF de intensidade moderada em relação aos animais controle, implicando na efetividade do TF na redução do estresse oxidativo. Palma et al. (2016) [116] observaram redução da NADPH oxidase, da peroxidação lipídica e da oxidação proteica em ratas espontaneamente hipertensas e ovariectomizadas ao submetidas a oito semanas de TF de moderada intensidade.

Leichtweis et al. (1997) [117] revelaram uma diminuição significativa na respiração do estado 4 de mitocôndrias cardíacas de ratos submetidos a um vigoroso programa de treinamento de natação (6h/dia, 5 dias/semana, 8–9 semanas) usando malato-piruvato e 2-oxoglutarato como substratos respiratórios. Esta mudança inesperada induzida pelo treinamento físico ocorreu em mitocôndrias cardíacas de ratos sham e isquemia-reperfusão. Embora os mecanismos de defesa antioxidante mitocondrial não tenham sido modificados significativamente após esse estímulo relacionado ao *overtraining*, os autores observaram uma redução da peroxidação lipídica mitocondrial nos corações dos ratos submetidos ao treinamento.

Tem sido sugerido na literatura que a prática regular de exercícios físicos pode diminuir a predisposição a formação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), bem como reduzir os efeitos deletérios do Ca^{2+} na respiração mitocondrial. Já está bem estabelecido que o acúmulo excessivo de Ca^{2+} mitocondrial pode levar à ruptura da organela, mas por outro lado, a captação moderada de Ca^{2+} pela mitocôndria estimula a ação da piruvato desidrogenase e de enzimas relacionadas ao Ciclo de Krebs, resultando em maior produção de NADH e uma consequente síntese melhorada de ATP [118, 119]. Em um estudo com modelo experimental, foi demonstrado que 14 semanas de exercício aeróbico foram eficientes na prevenção de formação dos PTPM, de redução na fosforilação oxidativa e da

formação de produtos derivados da oxidação em animais tratados com fármaco cardiotoxíco utilizado no tratamento contra o câncer. Os autores sugerem que devido ao fato dos PTPM apresentarem etiologia oxidativa, é provável que os efeitos benéficos do exercício nessa variável sejam mediados, dentre outros fatores, pela restauração da homeostase redox no cardiomiócito dos animais treinados, contribuindo diretamente para a redução da morte celular programada [120].

Outro fator relacionado aos efeitos desencadeados pelo TF sobre a função/dinâmica mitocondrial é o processo de biogênese e de síntese dos componentes da CTE com o intuito de apoiar o aumento da demanda energética celular, fator que contribui para a melhora da contratilidade do cardiomiócito [107, 121, 122]. A biogênese mitocondrial é um processo complexo que abrange vários mecanismos responsáveis pela síntese e estruturação dos componentes da organela, que controla o número de mitocôndrias e determina a produção celular de energia[123].

O exercício físico realizado cronicamente desempenha importante papel no metabolismo energético, promovendo uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos que levam à biogênese mitocondrial em todos os tipos de fibras musculares [124]. Esses efeitos resultam em melhora na resistência à fadiga e controle do peso corporal, o que está fortemente relacionado a um aumento na atividade enzimática mitocondrial e produção de ATP. Evidências mostram que a atividade contrátil leva à biogênese mitocondrial por aumento nas concentrações de cálcio citoplasmático e formação do complexo cálcio/calmodulina, aumento no consumo de oxigênio e formação de EROs[125], ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e produção de NO [93] e aumento da razão AMP/ATP, e subsequente ativação da proteína quinase ativada pelo AMP, a AMPK [126, 127], que age como um “sensor” de energia celular e é ativada por um

aumento da formação de AMP através do consumo de ATP. A AMPK desempenha diversas ações no metabolismo [128], incluindo a ativação de PGC-1 α que promove a sinalização para a biogênese mitocondrial.

O aumento na biogênese mitocondrial na musculatura esquelética promovida pelo TF já está bem elucidado na literatura [123, 129]. Chow et al. (2007) [130] demonstraram, em modelo animal, que 8 semanas de treinamento aeróbico em esteira a 80% do $VO_{2m\acute{a}x.}$, produz aumento da atividade de enzimas mitocondriais (citrato sintase e citocromo c oxidase), maior eficiência da fosforilação oxidativa (síntese de ATP) e do consumo de O_2 , fatores que indicam aumento da função mitocondrial muscular. O TF provoca um aumento intermitente do cálcio sarcoplasmático, o qual muda o estado de fosforilação de fatores de transcrição e co-ativadores importantes, resultando assim no aumento da expressão de proteínas, como PGC-1 α [131]. O aumento da expressão PGC-1 α durante uma sessão aguda de exercício físico pode ser modulado pela diminuição do fluxo de ATP no músculo esquelético. O aumento da relação de AMP/ATP e ativação da AMPK no músculo são provocados por proliferação mitocondrial [132]. A interação multifacetada entre PGC-1 α e AMPK desempenha um papel chave neste processo [133]. Além disso, o PGC-1 α é um sítio de ligação direta para o fator intensificador de miócito 2 (MEF2), que regula os tipos de fibras musculares, particularmente as do tipo lenta, resultando em aumento da atividade de endurance [134, 135]. A mudança do tipo de fibra para o tipo oxidativo pelo PGC-1 α é caracterizada pelo aumento da produção mitocondrial, densidade e metabolismo oxidativo [136].

Contudo, sobre os efeitos do TF na biogênese mitocondrial no coração, as investigações não são tão consistentes. A adaptação do músculo cardíaco ao exercício crônico envolve remodelamento e hipertrofia de cardiomiócitos. Se isso é

acompanhado por um aumento no metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial ainda não tem sido bem discutido. Alguns estudos demonstraram que o treinamento físico regular induz aumento na expressão e atividade de enzimas cardíacas [121, 137]. Outros mostraram que as respostas adaptativas hipertróficas não envolvem mudanças na atividade da enzima CPT-1 ou OXPHOS (complexos da CTE) e nenhuma alteração na densidade mitocondrial, distribuição e biogênese mitocondrial induzida pelo PGC-1 α [138, 139]. No entanto, outros autores relatam um aumento de PGC-1 α e conteúdo de Tfam, mas sem modificação na atividade enzimática mitocondrial ou capacidade oxidativa [140, 141]. Apesar das diferenças entre esses achados, parece que a biogênese mitocondrial responde as demandas exigidas pelo exercício, e o aumento da massa cardíaca durante a hipertrofia induzida pelo TF pode ocorrer sem prejuízos a outras organelas intracelulares. Além disso, nem aumento [121, 142] nem alteração [105] na capacidade de utilização de ácidos graxos foram relatados, sugerindo que, na hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício, a produção de energia ainda depende amplamente da oxidação de ácidos graxos.

A divergência nos dados da literatura pode ser atribuída às diferentes metodologias empregadas. Eisele et al. (2008) não encontraram alterações na biogênese mitocondrial no coração de camundongos submetidos a quatro semanas de atividade física voluntária [143]. Li et al. (2011) também obtiveram a mesma resposta observada em camundongos após doze semanas de TF em esteira rolante [123]. Kraljevic et al. (2013) também não encontraram alterações na expressão do PGC1 α , após 8 semanas de exercício aeróbico intervalado em fêmeas submetidas a cirurgia de IM [144]. Em contrapartida, Budiono et al. (2012) demonstraram que o TF exerce papel significativo na síntese mitocondrial cardíaca. Os autores observaram que 7 dias de corrida voluntária em camundongos foram suficientes para desencadear

um aumento na biogênese mitocondrial uma vez que além de suportar incrementos na demanda metabólica, ainda protege o tecido cardíaco contra os danos promovidos pela isquemia[145].

O PGC-1 α também promove uma resposta biogênica mitocondrial mais ampla por meio de sua interação com o receptor relacionado ao estrogênio (ERR) e com o NRF-1 [146]. No miócito cardíaco, o ERR ativa diretamente a expressão de genes envolvidos em praticamente todos os aspectos do metabolismo energético mitocondrial, incluindo o ciclo de Krebs, o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, além das enzimas de oxidação dos ácidos graxos mitocondriais [147]. No entanto, o papel preciso para ERR na adaptação cardíaca ao exercício ainda não está bem elucidado. Considerando que a biogênese mitocondrial envolve a coordenação de diferentes eventos celulares, a simples avaliação da expressão gênica ou proteica de fatores de transcrição que codificam proteínas mitocondriais, como o PGC1- α , pode superestimar o processo como um todo.

1.4 Justificativa

As diferenças de sexo na incidência e prevalência de DCV sugerem que os hormônios sexuais femininos desempenham um papel chave na manutenção da função cardíaca normal. Está bem descrito na literatura que há uma menor incidência de doenças cardíacas em mulheres jovens quando comparadas a homens pareados por idade. Contudo, após a menopausa, a incidência de DCV em mulheres pode ser igual ou até maior do que a observada em homens. Essas observações levaram à hipótese de que a incidência aumentada de DCV em mulheres após menopausa poderia estar associada à queda dos níveis de hormônios sexuais femininos [148-150]. Nessa linha, é bem estabelecido que os estrógenos, particularmente E2,

desempenham um papel significativo no acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco, através da sua contribuição na regulação do retículo sarcoplasmático (RS), na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e no estresse oxidativo. Por outro lado, a deficiência de estrogênio pode induzir disfunção contrátil, pelo menos em parte, pela ativação do receptor do tipo 1 de angiotensina II (Ang II) [11, 28, 151].

A disfunção do ventrículo esquerdo (VE) é acompanhada de desajuste no metabolismo e na bioenergética mitocondrial, o que contribui para o desenvolvimento e progressão da disfunção cardíaca. De fato, há uma íntima conexão entre a dinâmica contrátil miocárdica e o metabolismo oxidativo, uma vez que o suprimento energético deve ser equiparado a demanda, devido ao alto requerimento para sustentar a função contrátil. No coração adulto, quase toda a produção de energia se origina da fosforilação oxidativa mitocondrial continuamente gerada pela oxidação dos substratos [152].

Há uma crescente evidência de que a deficiência de estrogênio prejudica a função das subpopulações mitocondriais cardíacas espacialmente distintas, sugerindo que a proteção observada em fêmeas poderia decorrer de alterações na função mitocondrial regulada pelo estrogênio [153, 154]. O prejuízo da função mitocondrial foi observado em ratas com deficiência de hormônios sexuais, acarretando em disfunção cardíaca [154-156]. A disfunção mitocondrial leva à desregulação dos processos de sobrevivência celular envolvidos na produção de adenosina trifosfato, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, com consequente apoptose [91, 157, 158].

A segurança da terapia de reposição hormonal sobre a função cardiovascular tem sido discutida. Dois grandes estudos prospectivos falharam em demonstrar

melhoras em mulheres na menopausa submetidas à terapia de reposição hormonal. Esses resultados encontrados no *Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study* e *Women's Health Initiative (WHI)* contrastaram com uma série de estudos em modelos animais nos quais o estrogênio se mostrou protetivo [11, 28, 29, 159, 160]. Assim, novas terapias farmacológicas e não farmacológicas foram propostas como alternativas.

O treinamento físico aeróbico é uma intervenção bem conhecida capaz de melhorar a função cardiovascular em pessoas saudáveis e doentes, além de ser considerado um método efetivo para prevenir ou tratar muitas DCVs [73, 161]. Além disso, o TF provoca uma série de adaptações bioquímicas e moleculares no miocárdio [98] e melhora a função mitocondrial cardíaca [48]. Em geral, os benefícios são deflagrados por aumento do dispêndio energético, tendo um impacto no metabolismo mitocondrial, com efeitos subsequentes em uma gama de processos de sinalização intracelular, tais como, aumento na atividade dos complexos respiratórios da cadeia de transporte de elétrons (CTE) e consequente redução na produção de EROs [162, 163].

O impacto do treinamento físico aeróbico sobre a disfunção mitocondrial cardíaca durante a privação dos hormônos sexuais femininos em ratos é ainda desconhecida. Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é que doze semanas de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada após a indução da privação dos hormônios sexuais em ratas possa estar associado a uma melhora dos parâmetros de contratilidade e de bioenergética cardíaca.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a contratilidade e a função bioenergética mitocondrial cardíaca em ratas ovariectomizadas.

2.2. Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a contratilidade e a função bioenergética mitocondrial cardíaca em ratas ovariectomizadas sobre:

1. A função contrátil de músculo papilar do VE;
2. O transiente de cálcio de cardiomiócitos isolados do VE;
3. A expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no VE;
4. A expressão das proteínas envolvidas no processo de fusão mitocondrial cardíaca nas subpopulações intermiofibrilar e subsarcolemal;
5. A eficiência da oxidação de substratos energéticos nas subpopulações mitocondriais cardíacas intermiofibrilar e subsarcolemal;
6. A expressão proteica dos complexos respiratórios da CTE nas subpopulações mitocondriais cardíacas intermiofibrilar e subsarcolemal;

7. A capacidade de retenção de cálcio nas subpopulações mitocondriais cardíacas intermiofibrilar e subsarcolemal e a expressão proteica do canal uniporter e da ciclofilina D;
8. A via da biogênese mitocondrial no VE e nas subpopulações mitocondriais cardíacas intermiofibrilar e subsarcolemal;
9. A produção de ânion superóxido mitocondrial cardíaca;
10. As enzimas antioxidantes e os níveis de proteínas carboniladas no VE e nas subpopulações mitocondriais cardíacas intermiofibrilar e subsarcolemal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais de Experimentação e Manutenção

Ratas Wistar (*Rattus Novergicus Albinus*), com 10 semanas de vida, com peso corporal entre 200 e 220 g, provenientes do Biotério Central, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, participaram deste desenho experimental. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (n = 4 por gaiola). Receberam água e ração (Purina Labina®) *ad libitum*. Foram mantidos em ambiente com temperatura (22-24°C) e umidade (40-60%) controlados, com regime de luminosidade ciclo claro/escuro 12/12 horas, durante o período de experimento. O controle ponderal foi acompanhado semanalmente através de balança de precisão durante o período de estudo. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Experimentação Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (Nº de protocolo 30/2014).

3.2. Ovariectomia

As ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia (Ovx) bilateral conforme protocolo previamente estabelecido [29, 160]. Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos a uma incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, tendo a cavidade peritoneal aberta para remoção dos ovários e ligadura da trompa uterina em ambos os lados. Em seguida, foi realizada uma sutura da musculatura e da pele. Ao final do procedimento, os animais receberam antibiótico e analgésico (Enrofloxacina - 2,5% - 0,1 mL e Meloxicam, ~ 0,2 mg/kg, ambos via intramuscular).

O protocolo de treinamento foi iniciado sete dias após o procedimento cirúrgico. Para comprovação da efetividade da cirurgia, após a eutanásia, o útero foi retirado e pesado. A figura 7 mostra o processo cirúrgico da ovariectomia.

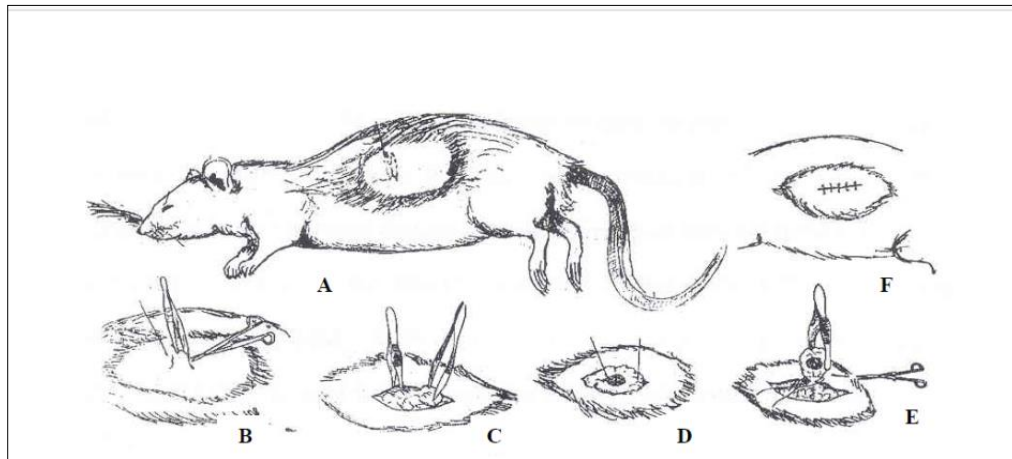


Figura 7: Cirurgia de castração (adaptado de Baker, 1979). A, Remoção de pelo. B, Incisão da pele. C, Incisão no músculo. D, Localização dos ovários. E, Remoção dos ovários. F, Sutura de músculo e pele.

3.3. Grupos experimentais:

No momento do procedimento cirúrgico de ovariectomia os animais foram divididos aleatoriamente entre as ratas que foram submetidas a cirurgia fictícia (Sham) e a remoção cirúrgica dos ovários (Ovariectomia) (Figura 8):

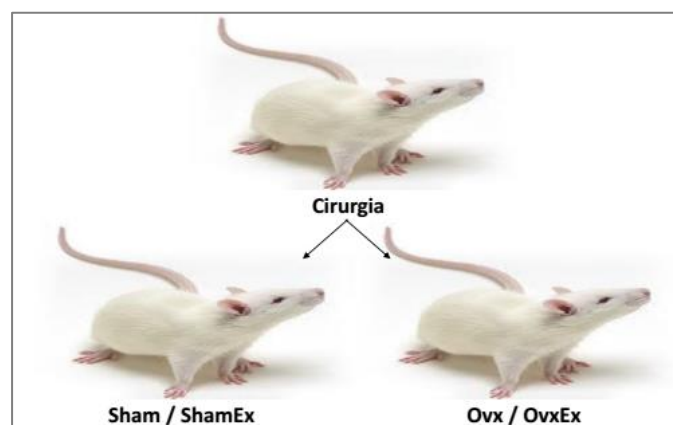


Figura 8: Divisão dos grupos experimentais.

3.4. Protocolo de Exercício Físico

O programa de corrida foi realizado em uma esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil) específica para ratos, 5 dias por semana, durante 12 semanas, por 60 minutos (Figura 9). Todo o protocolo de treinamento físico aeróbico e de teste utilizados foram adaptados de Carneiro-Júnior et al. (2013) [164].

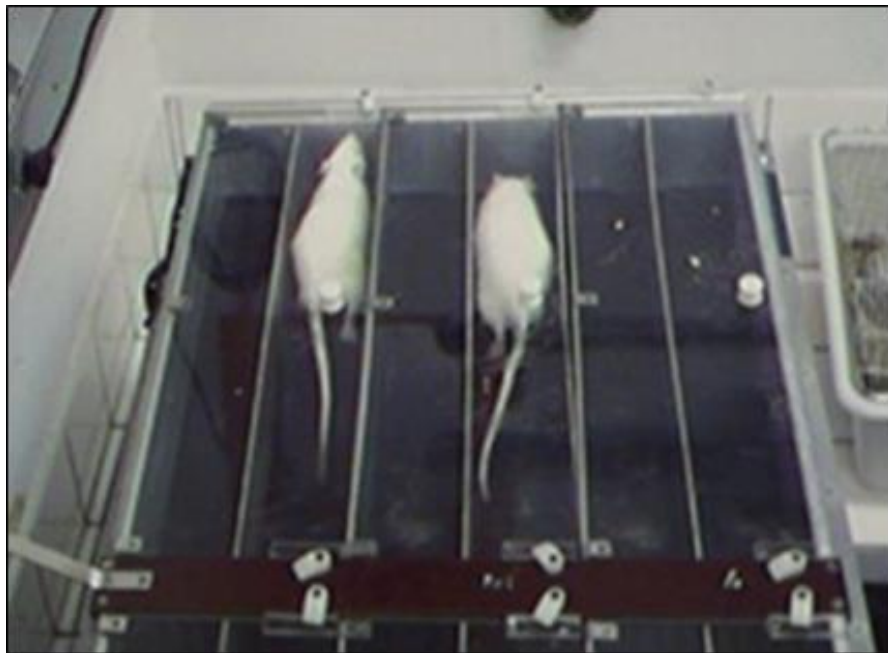


Figura 9. Esteira motorizada para ratos utilizada para execução do treinamento físico (Insight Instrumentos - Ribeirão Preto, SP, Brasil).

a) *Protocolo de familiarização e adaptação ao treinamento físico:*

Antes do início do treinamento físico, todos os animais foram colocados na esteira rolante para familiarização e adaptação.

As duas primeiras semanas de familiarização/adaptação tiveram duração de sessão entre 10 e 30 minutos/dia, com velocidade fixa de 10 m/min, 0° de inclinação.

- Semana 1 – familiarização: velocidade fixa de 10 m/min e duração de 10 min/sessão.

- Semana 2 – adaptação: velocidade fixa de 10 m/min e duração progressiva de 10 a 30 minutos/sessão.

Após este período, os animais que não se adaptaram a corrida foram direcionados para o experimento piloto de técnicas.

Após 48 horas, os animais que cumpriram a semana de adaptação, foram submetidos ao teste na esteira rolante para determinação da velocidade máxima de corrida (VMC).

b) *Teste de velocidade máxima de corrida*

O teste foi iniciado com velocidade a 10 m/min, 0° de inclinação. A cada 3 minutos transcorridos, foi realizado um incremento de 3 m/min na velocidade. Isto se deu até a fadiga voluntária dos animais. O momento da fadiga foi definido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira e não responderam após 10 segundos de estímulo elétrico. A intensidade do protocolo de treinamento foi monitorada através do aumento progressivo do tempo e da velocidade de corrida, que considerou a intensidade percentual a VMC.

O teste na esteira rolante para determinação da VMC foi realizado em cada animal de todos os grupos experimentais no início da terceira semana e ao final da 12ª semana do programa de treinamento. Ao final da sexta semana, apenas os animais dos grupos treinados (ShamEx e OvxEx) fizeram novo teste de VMC para ajustar a velocidade de acordo com a intensidade estabelecida (velocidade de corrida).

O detalhamento do protocolo, está descrito na sequência e ilustrado na figura 10.

- Semana 3 – teste inicial de VMC em todos os animais.

- Semanas 3 e 4 – Corrida a 50% de VMC. Grupos exercitados Sham e Ovx.
- Semanas 5, 6, 7 e 8 – Corrida a 60% de VMC. Grupos exercitados Sham e Ovx.
- Semana 6 – Re teste de VMC apenas para os grupos ShamEx e OvxEx.
- Semanas 9, 10, 11 e 12 – Corrida a 70% de VMC. Grupos exercitados Sham e Ovx.
- Semana 12 – teste final de VMC em todos os animais.
- Duração – 60 minutos/dia, da semana 3 até o final do protocolo, na 12ª semana.

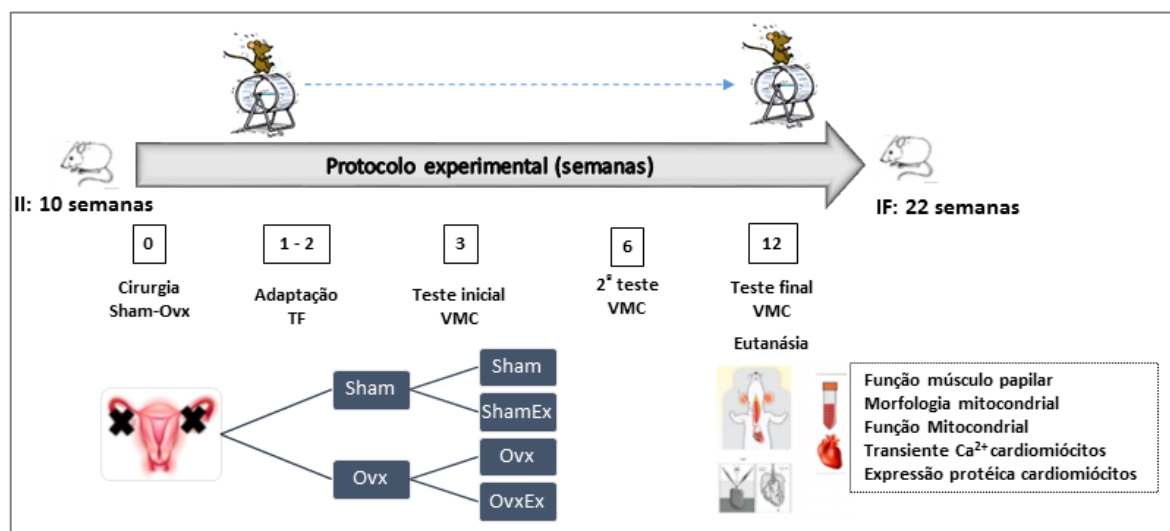


Figura 10. Representação esquemática do protocolo experimental. II: idade inicial. IF: idade final. Sham-Ovx: cirurgia fictícia de remoção bilateral dos ovários e cirurgia de remoção dos ovários. ShamEx-OvxEx: cirurgia fictícia de remoção bilateral dos ovários e cirurgia de remoção dos ovários, ambos submetidos ao treinamento físico (TF). VMC: velocidade máxima de corrida.

3.5. Eutanásia

Ao final das 12 semanas de treinamento, 48 h após o último teste de velocidade máxima de corrida, os animais foram heparinizados (500 U/kg) via intraperitoneal (*i.p.*)

e anestesiados com Uretana, também por via *i.p.* (1,2 g/kg, Sigma, SP, Brasil). Após verificação dos sinais de estado anestésico, a eutanásia foi procedida por exsanguinação por meio da secção das artérias carótidas e veias jugulares. Anteriormente a exsanguinação, foi realizada uma incisão longitudinal toracoabdominal e coletado amostra sanguínea da aorta abdominal, mantida a temperatura de 7 °C e centrifugada para obter alíquotas de plasma e soro. Em seguida, foram removidos e pesados os seguintes tecidos: a) coração; b) gorduras parametrial, mesentérica, retroperitoneal e visceral, c) útero e ovário, d) pulmão; e) músculo sóleo. O comprimento da tíbia direita foi utilizada para normalização dos pesos do coração. Amostras do tecido do VE e do músculo esquelético sóleo, foram reservados para análise da expressão proteica e atividade enzimática conforme os objetivos propostos. Todo o material biológico coletado foi armazenado em temperatura a -80°C.

Na tentativa de atender a todos os experimentos propostos neste projeto foi necessária uma divisão dos lotes experimentais, visto que para cada metodologia um processamento específico do tecido cardíaco se fez necessário. Nesse sentido, o número de animais utilizados e a técnica empregada em cada experimento se encontram detalhados ao longo do texto.

3.6. Análise “in vitro” da mecânica miocárdica

O isolamento do músculo papilar foi realizado segundo protocolo já estabelecido em nosso laboratório [29, 160]. O coração foi retirado rapidamente do tórax e colocado em solução de Krebs-Henseleit, previamente oxigenada com mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, e aquecida a 30°C. A parede livre do ventrículo direito foi separada para expor o septo interventricular, que

foi dividido ao meio para que os músculos papilares do ventrículo fossem adequadamente expostos. O músculo papilar posterior (amostra do ventrículo esquerdo) foi cuidadosamente dissecado numa plataforma de silicone e suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, sendo em seguida imerso em uma cuba contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit. A extremidade superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável a um transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) e o anel da extremidade inferior do músculo conectado a um gancho fixo na cuba de vidro como mostra a figura 11. A solução de Krebs-Henseleit (KH) é composta, em mM: 135 NaCl; 4,6 KCl; 1,25 CaCl; 1,15 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 36 NaHCO₃ 5,5 glicose, pH 7,4 e oxigenação mantidos pelo borbulhamento de mistura gasosa e temperatura controlada em 29 °C por meio de um banho-maria circulante. O transdutor foi conectado a um microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, EUA) que permitia determinar os valores das variáveis fisiológicas analisadas. Paralelamente ao músculo, posicionam-se dois eletrodos de prata acoplados a estimulador elétrico que liberam estímulos em onda quadrada de 5 milissegundos de duração. Todos os músculos foram estimulados em frequência de 0,5 Hz e 10 V.

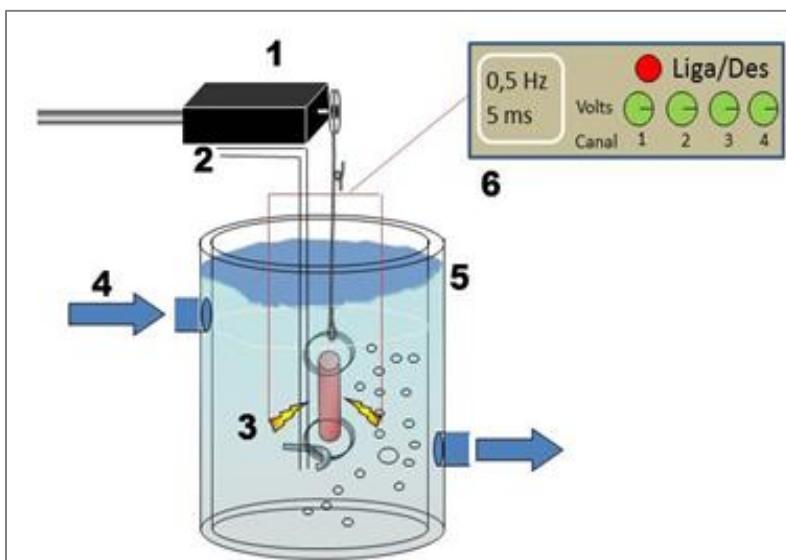


Figura 11 . Esquema representativo do sistema de avaliação da contratilidade de músculo papilar intacto. 1: transdutor de força, 2: sistema de aeração com mistura carbogênica, 3: eletrodos, 4: banho, 5: cuba, 6: eletroestimulador.

Foram feitos sucessivos estiramentos, até atingir o ápice da curva estiramento-tensão e, então, determinado seu $L_{\text{máx}}$ (comprimento diastólico da fibra muscular associado à máxima força isométrica desenvolvida). O músculo permaneceu em contração isométrica estável em $L_{\text{máx}}$ por 60 minutos antes do início dos experimentos.

Para a avaliação da resposta contrátil concentrações crescentes de cálcio, foram analisados os seguintes parâmetros descritos a seguir e esquematizados na figura 12:

- **Força:** força isométrica desenvolvida. A força desenvolvida foi normalizada pelo peso do respectivo músculo, sendo expressa como g/mg;
- **Peso:** peso do músculo, expresso em mg.

A solução nutritora foi trocada por uma solução contendo a metade da concentração de Ca^{2+} (0,62 mM de CaCl_2). Foram adicionadas doses de uma solução com elevada concentração de cloreto de cálcio (500 mM), para avaliação da resposta inotrópica do músculo ao Ca^{2+} . De uma solução concentrada (500 mM de CaCl_2) foram adicionados, em intervalos de 1,5 minutos, 25 μL , 50 μL e 50 μL para construir uma curva de resposta inotrópica do músculo papilar ao cálcio nas concentrações de (0,62; 1;25, 2,5 e 3,75 mM CaCl_2).

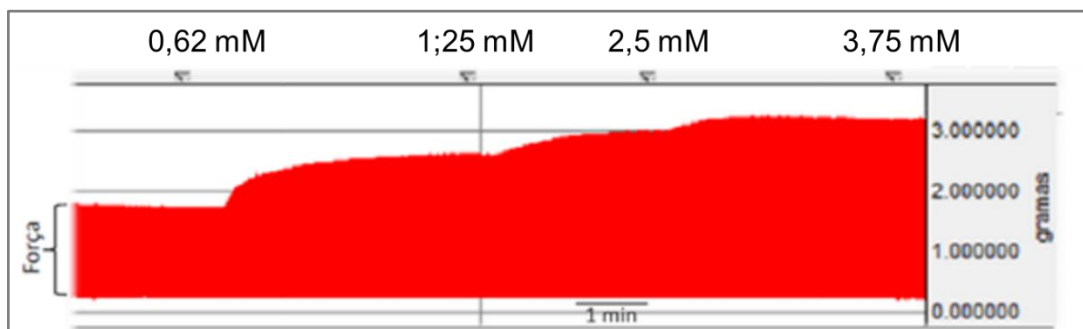


Figura 12. Registro típico demonstrando a variação de força de contração isométrica (g) em uma curva concentração-resposta a mudanças nas concentrações de cálcio extracelular (CaCl_2 : 0,62; 1,25; 2,5 e

3,75 mM) obtida em preparação de músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento físico aeróbico.

Terminadas as manobras de avaliação da contratilidade do músculo papilar, os mesmos foram retirados do sistema e o segmento miocárdico contido entre os anéis de aço isolado foi pesado em balança de precisão (peso úmido).

3.7. Função mitocondrial cardíaca

Após a remoção do coração, o órgão foi colocado em recipiente contendo solução tampão *Chappel-Perry* - CP (100 mM KCl; 50 mM MOPS; 5 mM MgSO₄; 1 mM EGTA, 1 mM ATP e 2 mg/mL albumina bovina - BSA) a baixas temperaturas (~4°C) e dissecado, utilizando-se apenas o VE para a extração mitocondrial.

a) Isolamento mitocondrial

As duas subpopulações mitocondriais (subsarcolemal - SSM e intermiofibrilar - IFM) foram isoladas a partir do VE (~ 0,6 g de tecido) de acordo com o protocolo descrito por Palmer et al. (1977) [45] e adaptado/modificado por Ribeiro et al. (2014) [165], pois alguns estudos sugerem diferenças funcionais entre as subpopulações [46]. O tecido cardíaco foi lavado, fragmentado e homogeneizado em 22,5 ml do tampão *Chappel-Perry* (pH 7.4, 4 °C). Em seguida o homogeneizado foi centrifugado (Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Germany) a 580 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante (S1) resultante desta primeira centrifugação foi filtrado com auxílio de uma gaze e reservado. O *pellet* desta primeira centrifugação foi ressuspenso em 7,5 mL do mesmo tampão e novamente centrifugado a 580 x g por 10 min. O sobrenadante (S2) desta segunda centrifugação foi filtrado e adicionado ao S1. Em seguida, o sobrenadante (S1 + S2) foi novamente centrifugado à 580 x g por 7 min. O

sobrenadante resultante desta centrifugação é novamente centrifugado. O *pellet* remanescente a esta centrifugação corresponde à subpopulação SSM. O *pellet* remanescente da segunda centrifugação foi ressuspensionado em 9 mL de tampão *Chappel-Perry* com adição de 5 mg de tripsina por grama de tecido. Em seguida, uma segunda homogeneização foi realizada e as amostras foram agitadas (agitador magnético, ika® c-mag hs10, EUA) em banho de gelo por 10 min, para digerir os miofilamentos. Após agitação, foram adicionados 10 mL de tampão *Chappel-Perry* contendo BSA (fraction V, fatty acid free) a 2 mg/mL e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a $7.500 \times g$ por 10 min a 4°C . O *pellet* foi novamente ressuspensionado em 7,5 mL do tampão *Chappel-Perry* e centrifugado a $580 \times g$ por 7 min a 4°C . O sobrenadante desta última centrifugação foi filtrado e novamente centrifugado a $3.000 \times g$ por 7 min. O *pellet* final corresponde a subpopulação IFM. Os pellets correspondentes a subpopulação SSM e IFM foram lavados duas vezes em tampão KME (contendo 100 mM de KCl, 50 mM de Mops e 0,01 M de EGTA) e novamente centrifugados a $3.000 \times g$ por 7 min. Os *pellets* foram ressuspensionados em 200 μL de tampão KME e a concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry [166]. A figura 13 mostra desenho esquemático do isolamento mitocondrial.

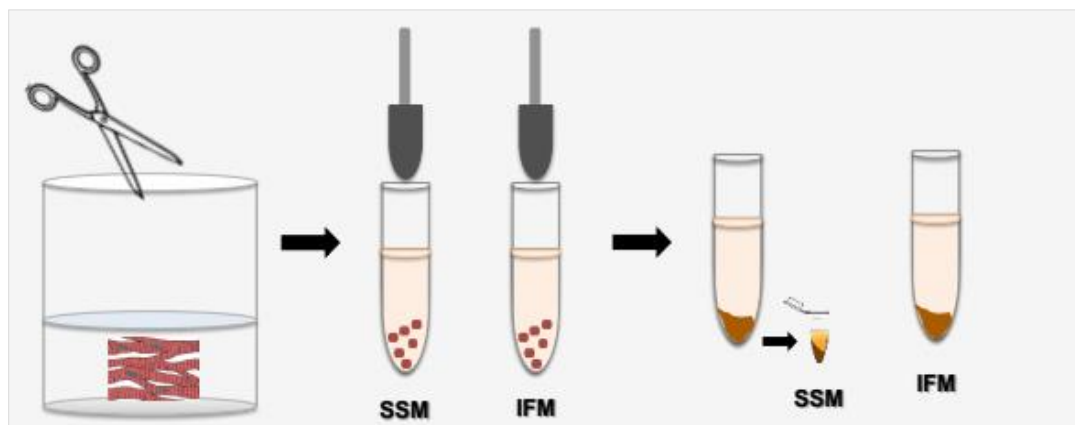


Figura 13: Subpopulações mitocondriais subsarcolema (SSM) e intermiofibrilar (IFM) (adaptado de DO VAL LIMA, 2017).

b) Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa

A análise funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foi avaliada com o auxílio de um transdutor para medida de oxigênio (*Clark electrode, Qubit system, Kingston, ON, Canada*). As frações isoladas mitocondriais (0,25 mg/mL) foram incubadas em um tampão para respiração mitocondrial (100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA and 1 mg/ml BSA/Fraction V, pH 7.4) como descrito por Palmer *et al.* (1977) [45] e modificado por Ribeiro *et al.* (2014) [165]. O estado III, resultante da velocidade de consumo de oxigênio quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável com ADP, produzindo assim o ATP e, o estado IV, resultante da velocidade do consumo de O_2 após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível, foram medidos com a adição dos substratos glutamato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), piruvato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), palmitoil-L-carnitina (40 μM) e Succinato + inibidor Rotenona (20 μM e 7,5 mM, respectivamente). Após a adição dos substratos, foi adicionado ADP para atingir uma concentração final de 200 μM , sendo observado um aumento do consumo de oxigênio em função do tempo. Após completa depleção do ADP, observado pelo surgimento do estado IV, adicionou-se oligomicina, um inibidor da ATP sintase (fração F₀) da cadeia respiratória. Os estados III, IV e IV + oligomicina, a razão de controle respiratório (RCR - razão do estado III/estado IV) e razão ADP:O foram calculados posteriormente. Os estados 3 e 4 são expressos como nanomol de consumo de O_2 normalizado por proteína mitocondrial por minuto ($\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). A razão RCR indica o acoplamento da cadeia respiratória e a razão ADP:O (razão fosfato inorgânico/oxigênio), indica o quanto de O_2 é reduzido em H_2O na fosforilação

oxidativa, indicando sua eficiência. A Figura 14 mostra o esquema representativo da oxidação fosforilativa.

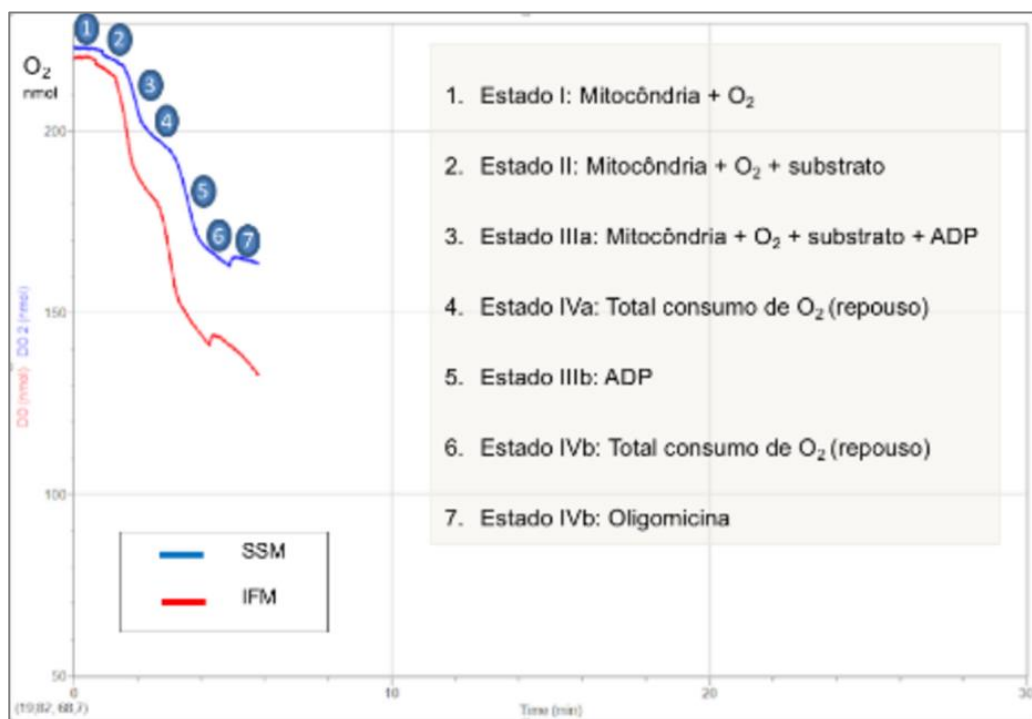


Figura 14. Esquema ilustrativo da mensuração da respiração mitocondrial (estado I a IV e a razão estado III/estado IV) pelo consumo de oxigênio (O_2).

c) Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial

A capacidade de retenção de Ca^{2+} foi avaliada em ambas as subpopulações mitocondriais seguindo a $[Ca^{2+}]$ extramitocondrial com uma exposição progressiva ao Ca^{2+} conforme descrito previamente [153]. Usando um leitor de placa fluorométrica de 96 poços a 37 °C, 250 µg/mL de proteína mitocondrial (200 µL volume final) foram incubados numa solução tampão livre de cálcio (100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM glutamato, 2,5 mM malato, a 37 °C) em um fluorômetro com monitoramento constante da fluorescência (Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, EUA). Em seguida, foi adicionado um marcador de cálcio (750 nM *calcium green-5N*, Invitrogen) com excitação e emissão de fluorescência

entre 488 e 530 λ , respectivamente. Uma injeção *in bolus* de Ca^{2+} livre de 25 nmol foi injetada a cada 7 min, e a $[\text{Ca}^{2+}]$ extramitocondrial foi registrada a cada 2 seg. usando 750 nM de Cálcio Verde-5N. A probabilidade de abertura do poro mitocondrial foi corrigida pela quantidade de cálcio captada uma vez que o aumento do cálcio no interior do poro pode induzir a abertura do mesmo.

3.8. Avaliação do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados

Após a remoção dos corações (quatro animais de cada grupo), os cardiomiócitos foram isolados conforme descrito previamente por Guatimosim et al. (2001) [167]. O coração foi rapidamente removido e retro-perfundido pelo método de *Langendorff*, com solução *Tyrode* modificada livre de Ca^{2+} (NaCl 131 mM, KCl 5,4mM, Hepes 25mM, NaH_2PO_4 0,33mM, MgCl_2 0,5 mM e glicose 22mM, pH 7.4), suplementada com 10U/L de insulina para lavagem e retirada do sangue. Na sequência, o órgão foi perfundido com solução *Tyrode* contendo CaCl_2 50 μM e collagenase tipo 2 (1 mg/mL, (Worthington, EUA). Após a etapa de digestão enzimática, os átrios foram removidos e o coração foi cortado em pedaços de 1mm, agitado por 4 minutos e filtrado através de uma malha de 200 μm para remoção do tecido não digerido. A concentração de CaCl_2 extracelular foi progressivamente aumentada para 500 μM por meio de três ciclos de centrifugação (Figura 15).

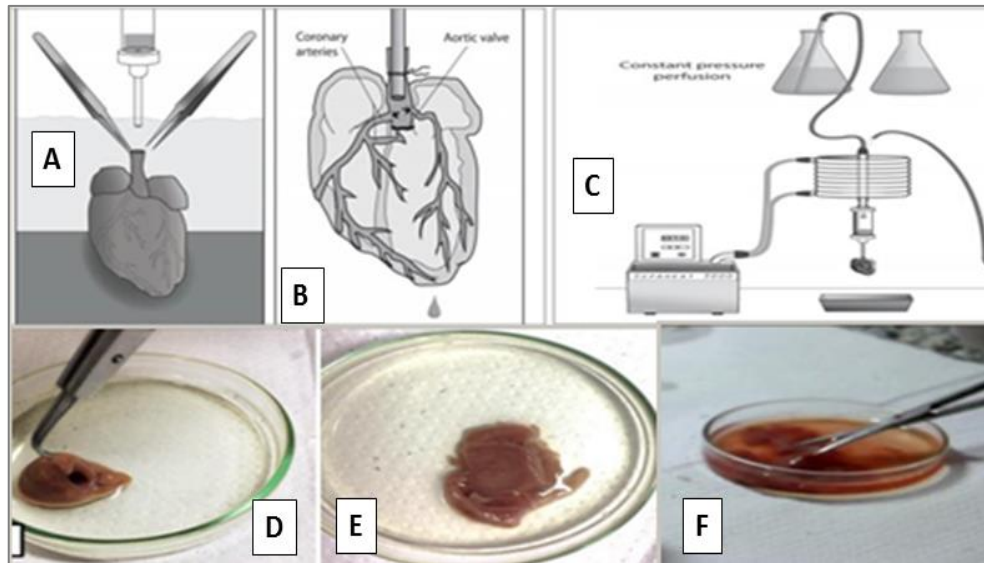


Figura 15. Representação esquemática do isolamento de cardiomiócitos. **A:** canulação do coração pelo arco aórtico. **B e C:** perfusão pelo método de *Langendorff*. **D:** digestão enzimática com collagenase. **E:** remoção dos átrios e **F:** corte do coração em fragmentos menores (adaptado de LOUCH et al., 2011).

A aquisição de imagens e a medida da concentração intracelular de Ca^{2+} no miócito cardíaco foram realizadas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), com lente objetiva de aumento 63X, na configuração *line-scan*, com o intuito de obter informações sobre a amplitude e a cinética do transiente de Ca^{2+} , conforme descrito por Guatimosim et al. (2001) [167]. Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados com Fluo4-AM 6 μM (Invitrogen, EUA), uma sonda fluorescente sensível ao Ca^{2+} ($\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=515\text{nm}$), durante 35 minutos em temperatura ambiente (25-30°C). Após a marcação, o excesso da sonda foi removido e adicionados a solução Tyrode 1,8 mM Ca^{2+} para a realização dos experimentos. As células foram plaqueadas e visualizadas no microscópio confocal, e no momento do experimento estimuladas a 1 hertz, com um pulso quadrado de duração de 5 milissegundos e 30 volts. Para o registro do transiente de Ca^{2+} , oito pulsos elétricos foram aplicados e foram realizadas varreduras ao longo de uma linha (512 x 3000 pixels), com laser de argônio (488 nm) e frequência de

aquisição de 1,54 milissegundos. Os parâmetros avaliados foram: relação F/F_0 (máxima fluorescência/fluorescência basal), tempo para o pico da máxima fluorescência e tempo de recaptação de 50% (T50) do Ca^{2+} . O T50 foi avaliado a partir dos traçados de fluorescência do F/F_0 após o processamento digital de imagens realizado com o ImageJ Software (NIH). A Figura 16 representa a análise final para uma imagem de variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo. O ponto de início representa o instante de tempo em que é considerado o início da variação de fluorescência. O ponto de máxima fluorescência é o instante de tempo no qual é considerado o ponto de máxima intensidade de fluorescência (F). O ponto de fluorescência basal é considerado o background de fluorescência (F_0), sendo a relação entre os dois (F/F_0) o representante de variação global de Ca^{2+} . Os pontos em cinza representam de 10-90% da recaptação de Ca^{2+} .

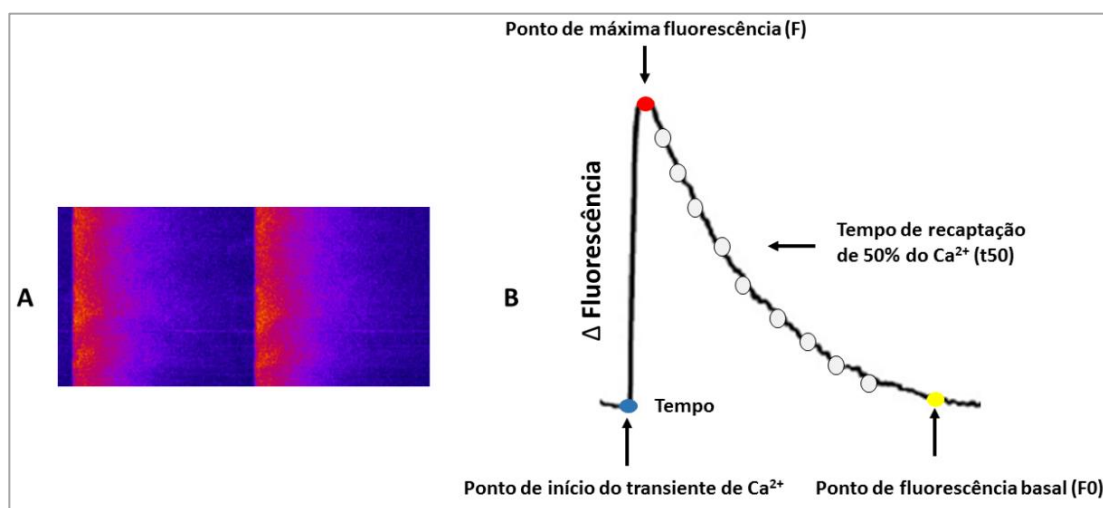


Figura 16. Esquema ilustrativo dos principais parâmetros avaliados no transiente de cálcio. **A:** Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados de ratas ovariectomizadas. **B:** Resultado da análise da imagem do transiente de Ca^{2+} e os parâmetros avaliados.

3.9. Produção mitocondrial de ânion superóxido em cardiomiócitos isolados

A quantificação do O_2^- mitocondrial no cardiomiócito isolado foi obtida através de imagens realizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), com lente objetiva de aumento 63X, adaptado de Batandier et al. (2006) [168]. Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados, durante 10 minutos à 37°C, com 7,5 μ M MitoSOX Red (MitoSox™, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) uma sonda fluorescente específica para mitocôndria que é oxidada na presença do O_2^- , emitindo a coloração vermelha. Após a marcação, o excesso da sonda foi removido e adicionamos solução *Tyrode* 1,8 mM Ca^{2+} para a realização dos experimentos. As células foram plaqueadas e visualizadas no microscópio e a produção mitocondrial de O_2^- foi estimada por mudanças na fluorescência (λ_{ex} = 510nm e λ_{em} = 580nm).

3.10. Ensaio de imunofluorescência

Para a quantificação da imunofluorescência do Tfam no cardiomiócito isolado foi utilizado o ensaio de imunofluorescência. A área superficial dos cardiomiócitos foi medida em células marcadas com α -actinina. Os cardiomiócitos isolados foram fixados usando paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos. As células foram lavadas 5 vezes em PBS e permeabilizadas com triton-X-100 a 0,2% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e incubadas em solução de bloqueio com 5% de BSA e anti-goat por 1 hora. As células foram incubadas “overnight” a 4°C em anticorpo primário anti-Tfam (1:50, Santa Cruz) ou anti-alfa actinina (1:150, Sigma). Após o período de incubação, as células foram lavadas 5 vezes com PBS com 1% de BSA e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-mouse (1:500, Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas 5 vezes com PBS com 1% de BSA. DAPI (4',6 – diamidino-2-fenil-indol) foi usado como um marcador de núcleo celular. A quantificação da imunofluorescência do Tfam no cardiomiócito isolado foi obtida através de imagens realizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), com lente objetiva de aumento 63X. Todas as imagens foram representativas de quatro experimentos independentes nos quais várias células foram avaliadas.

3.11. Análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia mitocondrial do ventrículo esquerdo foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), com o intuito de verificar possíveis mudanças na estrutura da mitocôndria. Para a MET, amostras de quatro corações de cada grupo experimental foram colhidas e fixadas em uma solução *Karnovsky*, contendo glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1M. Posteriormente, os tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em etanol (30%, 50%, 70%, 90%, e 100%) e embebidos em resina epóxi (*EMbed 812, Electron Microscopy Sciences*). Cortes ultrafinos (60-80 nm de espessura) foram obtidos em um ultramicrotomo (UCT, Leica Microsystems) antes das etapas de contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo. Micrografias eletrônicas representativas dos diferentes grupos foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão (*JEOL JEM-1400, Japão*) a 120 kV e 12000x de magnificação.

As imagens obtidas foram posteriormente analisadas através do *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) utilizando a ferramenta “*freehand selections*”. Para cálculo de parâmetros como área total, perímetro e

diâmetro máximo foram analisadas 1000 mitocôndrias por grupo, usando as médias de cada animal para cálculo da média total do grupo. Para mensuração do número de mitocôndrias por grupo foi utilizada a média do número de mitocôndrias presentes em 60 imagens com magnificação de 12000x obtidas a partir de cada grupo.

3.12. Análise da expressão proteica por meio da técnica de *Western blotting*

Para análise da expressão das proteínas do lisado cardíaco e da mitocôndria isolada e dos níveis de proteínas carboniladas foi utilizada como base a técnica de *Western Blotting*.

a) Expressão de proteínas no lisado cardíaco e na mitocôndria isolada

As amostras de tecido cardíaco (20 ou 80 µg) e da mitocôndria isolada (10 ou 30 µg) foram coletadas e imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-base, 5 mmol/L de EDTA, 2 Na, 50 mmol / L de Na₄P₂O₇.10H₂O, 1 mmol / L de MgCl₂, 1% de Nonidet P40, 0,3% de Triton x-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio, pH = 8), contendo inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma, EUA) e inibidores de fosfatase (20 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de Na₃VO₄) e os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos, a 11000 rotações por minuto em temperatura de 4°C. As proteínas totais foram medidas pelo método de Lowry [166]. Em seguida as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (5x, 2M Tris, pH = 6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue) e submetidas aos processos de eletroforese usando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 7,5%, 10% ou 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Após incubação com solução de bloqueio (Tris Base 20 mM, NaCl 100 mM pH 7,6, Tween a 0,1% com BSA 5% ou leite 5%) por 2 horas, as membranas

foram incubadas a 4°C, “overnight” com anticorpos específicos primários: anti-SERCA2 (1:1000. 80 µg. Santa Cruz 8094), mouse anti-Mfn-1 (1:100. 80 µg. Santa Cruz 166644), rabbit PGC-1α (1:500. 80 µg. Santa Cruz 13067), mouse anti-Tfam (1:1000. 30 µg. Santa Cruz 376672), rabbit anti-NRF-1 (1:500. 80 µg. Santa Cruz 33771), anti-MCU (1:1000. 20 µg. Sigma-aldrich HPA037480), Catalase (1:12000. 30 µg. Sigma-aldrich C0979), NOX-1 (1:400. 80 µg. Sigma-aldrich SAB4200097), NOX-4 (1:1000. 25 µg. Sigma-aldrich SAB1304615), CuZn-Sod (1:6000. 80 µg. Sigma-aldrich SAB 5200083) anti-OXPHOS (1:2500. 10 µg. Abcam 110413) and CypD (1:1000. 20 µg. Mitoscience 110324) anti-PLB (1:2000. 25 µg. Santa Cruz 393990), anti-AMPKα (1:1000. 80 µg. Cell Signaling #2532), anti-Mn-Sod (1:5000. 10 µg. Millipore 06-984) anti-NOX-2 (1:2500. 80 µg. BD Biosciences 611414). Após o período de incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas e incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) [1:5.000]: anti-mouse (1:5000; Sigma), anti-rabbit (1:5000; Sigma) ou anti-goat (1:5000, Sigma). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimioluminescência utilizando substrato de peroxidase (ECL Prime; Amersham, Little Chalfont, UK) e a reação foi captada usando o software *ChemiDoc system* (Bio-rad Image Lab 5.2.1). As imagens foram quantificadas usando o software *Image J* (Image V1.56; National Institutes of Health, EUA). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização no lisado cardíaco pela proteína GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 1:3000; Santa Cruz) ou por Ponceau para a mitocôndria isolada, com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas.

b) Detecção de Oxidação de Proteínas Carboniladas

O nível de proteínas carboniladas foi avaliado conforme descrito por Antony et al. (2004) [169], utilizando kit comercial (Oxyblot, Millipore). Nesse método, 20 µg do lisado mitocondrial foram incubados com DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) por 15 minutos, promovendo a reação de DNPH com grupos carbonil das cadeias laterais das proteínas, resultando em 2,4-dinitrofenilhidrazona. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) e em seguida foi realizada transferência (1 hora/100 volts) das proteínas separadas no gel para uma membrana. A ligação inespecífica de proteínas na membrana foi diminuída pela incubação destas com 10 mL de solução bloqueadora (5% de leite ou BSA em TBS-T) por 2 horas em temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com anticorpo primário (anti-DNP 1: 150) específico para 2,4-dinitrofenilhidrazona por 1 hora em temperatura ambiente. Na sequência as mesmas foram lavadas 8 vezes por 40 minutos com solução TBS-T (solução tampão Tris acrescida de tween-20) e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (anti-IgG 1:300) marcado com peroxidase em solução bloqueadora. Para determinar a especificidade das proteínas oxidadas, foi fornecido pelo kit um controle positivo. O tratamento das amostras com solução de controle serviu como controle negativo ao tratamento com DNPH. Como controle adicional, o anticorpo anti-DNP foi omitido. A imunodetecção das bandas foi promovida pela reação quimioluminescente após uso do sistema *ECL Western blotting Detection Reagents* (Amersham, EUA) e posteriormente quantificadas pelo sistema *ImageJ* (NIH, EUA).

3.13. Drogas e reagentes químicos

Sais e reagentes utilizados, quando não indicado de outro modo, foram adquiridos da Sigma and Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.14. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como Média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA) de duas vias foi usada para identificar possíveis alterações induzidas pelos fatores exercício e ovariectomia, seja isoladamente ou por interação. O teste *post-hoc* de *Fisher* foi usado para múltiplas comparações quando diferenças significantes foram detectadas pela ANOVA. O valor de alfa considerado como significativo foi de 5% ($p < 0,05$).

O número de animais (N) utilizado em cada protocolo experimental está descrito na sessão de Resultados.

4. RESULTADOS

Para o melhor entendimento dos resultados referentes aos efeitos de doze semanas de treinamento físico aeróbico sobre a contratilidade e bioenergética cardíaca em modelo animal de privação de hormônios sexuais femininos, organizaremos o texto em subseções.

4.1 Características gerais e medida da capacidade física

Os dados ponderais e as medidas de capacidade física ao teste de esforço estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

O peso corporal (PC) inicial não foi diferente entre os grupos. No entanto, o PC aumentou significativamente no grupo Ovx ($p < 0,01$) em relação ao Sham, que, no entanto, foi impedido pelo treinamento físico após 12 semanas ($p < 0,01$, OvxEx vs Ovx). Resultado semelhante foi obtido para o Σ de gordura corporal (parametrial, visceral, retroperitoneal). O peso do útero (PU) foi usado para avaliar a eficiência da ovariectomia. Como esperado, uma redução significativa no PU foi observada nos dois grupos Ovx ($p < 0,01$) em relação ao Sham, confirmando assim que a cirurgia foi bem sucedida. O peso do coração (PCor, $p < 0,05$) e o PCor ajustado ao comprimento da tibia ($p < 0,05$) foram significativamente alterados pela ovariectomia quando comparado ao grupo Sham. O peso do ventrículo esquerdo (PVE) e o PVE ajustado ao comprimento tibial não foram diferentes entre os grupos. Em relação ao ventrículo direito (VD), seu peso estava aumentado no grupo Ovx em relação ao Sham ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros ponderais das ratas Sham e ovariectomizadas após 12 semanas de treinamento físico aeróbico.

	Sham (n=12)	Ovx (n=12)	ShamEx (n=7)	OvxEx (n=8)
PC inicial (g)	206 ± 2	210 ± 4	212 ± 7	206 ± 7
PC final (g)	299 ± 9	342 ± 11*	279 ± 11	297 ± 4 [#]
Σ de gordura (g)	18 ± 2	24 ± 2*	14 ± 2	11 ± 1 ^{*#}
CT (CT, mm)	32,8 ± 0,3	32,7 ± 0,2	31,8 ± 0,4	32,5 ± 0,4
PU (mg)	687 ± 44	145 ± 18*	750 ± 62	159 ± 17*
PCor (mg)	794 ± 25	914 ± 64*	801 ± 33	820 ± 17
PCor/CT (mg/mm)	24,2 ± 0,7	28 ± 1.9*	25,1 ± 0,8	25,2 ± 0,7
PVE (mg)	565 ± 17	611 ± 24	568 ± 24	573 ± 11
PVE/CT (mg/mm)	17,2 ± 0,5	19 ± 0,7	18 ± 0,6	18 ± 0,4
PVD (mg)	0,15 ± 0,005	0,23 ± 0,06*	0,15 ± 0,006	0,16 ± 0,008

PC, peso corporal. Σ, somatório. CT: comprimento da tíbia. PU, peso do útero. PCor, peso do coração. PVE, peso ventrículo esquerdo. PVD, peso ventrículo direito. Dados expressos como Média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs Sham. [#] $p < 0,05$ vs Ovx. O número de animais está indicado entre parênteses.

Todos os animais foram submetidos ao teste de capacidade física em esteira rolante, até a exaustão, tanto no início quanto ao final do protocolo (Tabela 2). O tempo total até a fadiga (TTF) no início e no final do programa de treinamento foi obtido como uma medida do desempenho de corrida. Uma abordagem semelhante foi realizada para determinar a velocidade máxima de corrida no início e no final do programa de

treinamento. Como esperado, a variação do tempo até a fadiga ($p < 0,01$) e a velocidade máxima de corrida ($p < 0,01$) (ou seja, capacidade de corrida) foram substancialmente aumentadas em ambos os grupos treinados com exercício (Tabela 2). Cabe destacar que, antes do início do protocolo, a capacidade de corrida de todos os grupos era semelhante (TTF, em min: Sham: 23 ± 1 , Ovx: 23 ± 1 , ShamEx: 25 ± 1 e OvxEx: 24 ± 1) e (VMC, em m/min: Sham: 24 ± 1 , Ovx: 25 ± 1 , ShamEx: 26 ± 1 e OvxEx: 26 ± 1).

Tabela 2. Capacidade física de ratas ovariectomizadas após 12 semanas de treinamento físico aeróbico.

	Sham (n=12)	Ovx (n=12)	ShamEx (n=7)	OvxEx (n=8)
TTF (inicial, min)	23 ± 1	23 ± 1	25 ± 1	24 ± 1
TTF (final, min)	14 ± 1	14 ± 1	$38 \pm 2^*$	$35 \pm 3^{*#}$
VMC (inicial, m/min)	24 ± 1	25 ± 1	26 ± 2	25 ± 1
VMC (final, m/min)	19 ± 1	18 ± 1	$37 \pm 1^*$	$35 \pm 2^{*#}$

TTF, tempo total até a fadiga. VMC, velocidade máxima de corrida. Dados expressos como Média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. $*p < 0,05$ vs Sham. $^{#}p < 0,05$ vs Ovx. O número de animais está indicado entre parênteses.

4.2 Disfunção da contratilidade miocárdica induzida pela ovariectomia e respostas ao treinamento físico

A partir da caracterização do modelo animal e dos parâmetros de treinamento físico obtidos, nosso próximo objetivo foi avaliar a função contrátil cardíaca e as respostas ao treinamento físico aeróbico de ratas ovariectomizadas. Para isso, optamos por fazer as análises no músculo papilar e no cardiomiócito isolados.

A ovariectomia induziu uma diminuição significativa na força muscular do papilar isolado, como mostrado na figura 17A. Como esperado, o aumento de $[Ca^{2+}]$ extracelular resultou em uma resposta inotrópica positiva nos músculos papilares de todos os grupos. No entanto, a resposta inotrópica a $[CaCl_2]$ 1,25, 2,5 e 3,75 mM foi menor no grupo Ovx. Por outro lado, o treinamento físico evitou a redução da força contrátil, pois a resposta inotrópica dos músculos papilares do grupo OvxEx foi semelhante aos grupos Sham e ShamEx ($[Ca^{2+}]$ 3,75 mM: Sham vs Ovx, $p < 0,01$; Ovx vs ShamEx, $p < 0,01$; Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$; figura 17A).

As medidas dos transientes de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) foram realizadas em cardiomiócitos isolados do VE dos animais de todos os grupos experimentais. Apesar da redução da contratilidade observada no músculo papilar no grupo Ovx em comparação ao Sham, a amplitude do transiente de Ca^{2+} foi semelhante entre esses dois grupos. Por outro lado, o treinamento físico aumentou o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no grupo OvxEx ($p < 0,01$) (Figura 17B). Como a expressão da proteína SERCA2 estava diminuída no grupo Ovx comparado ao Sham, nós analisamos o tempo de recaptação ao cálcio (T50) como mostrado na figura 17C. A ovariectomia aumentou o T50 comprado ao Sham, indicando que a recaptação de cálcio é mais lenta no grupo Ovx (Sham vs Ovx, $p < 0,01$). O treinamento físico não foi capaz de reduzir o T50, ($p = 0,07$, Figura 17C).

A figura 17D apresenta os traçados gerados para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a figura 17E mostra os registros típicos das imagens de fluorescência nos cardiomiócitos dos animais dos grupos experimentais, incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz.

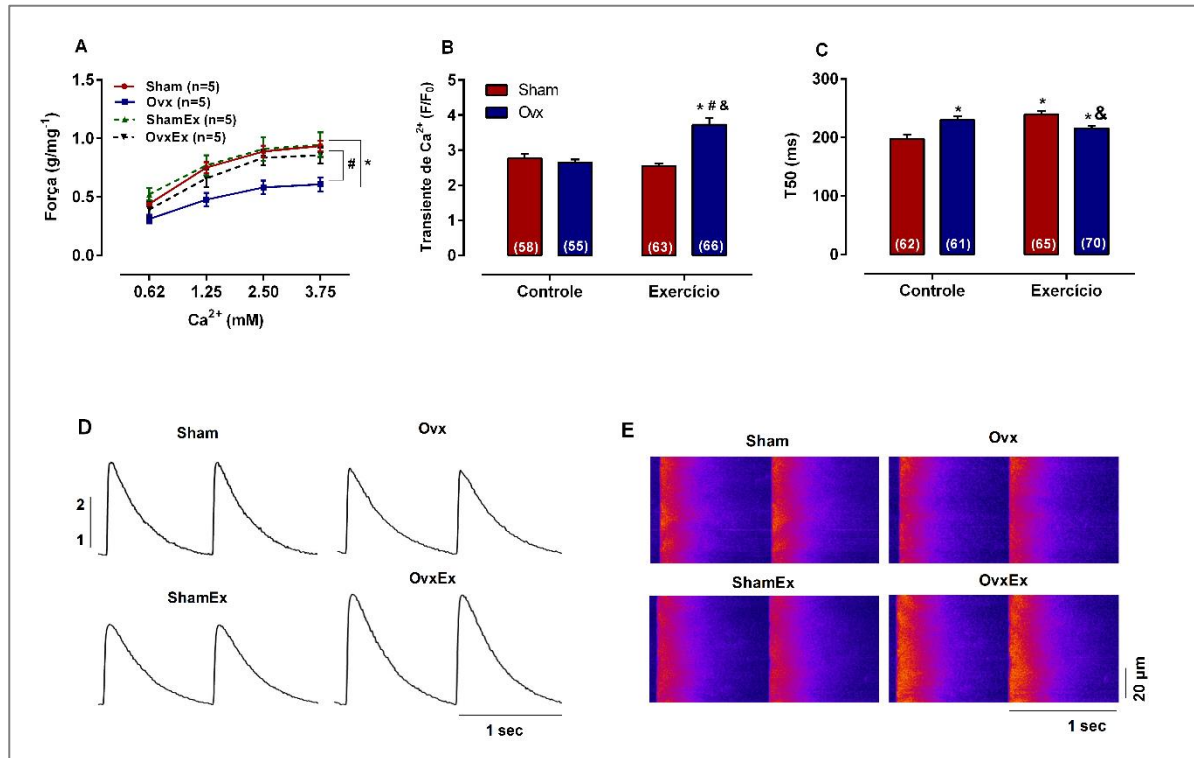


Figura 17. O treinamento físico aeróbico melhora disfunção contrátil cardíaca de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia. **A**, Força isométrica (g/mg) do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo medida com diferentes concentrações de $CaCl_2$ extracelular (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM). **B**, Amplitude do transiente de Ca^{2+} . **C**, Tempo 50% do decaimento do transiente de Ca^{2+} (T50 ms). **D**, Traçado representativo do transiente de Ca^{2+} . **E**, Imagens representativas da fluorescência do transiente de Ca^{2+} . Escala = 20 μ m. Os números entre parênteses nos experimentos com o cardiomiócito isolado indicam o número de células de quatro animais de cada grupo. Dados expressos como Média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs. ShamEx. O número de animais está indicado entre parênteses.

Para investigar as características intracelulares responsáveis pelas alterações na sinalização de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados de VE de ratas ovariectomizadas, nós avaliamos, posteriormente, os níveis de expressão de SERCA2 e PLB, dois determinantes moleculares chave do transiente de Ca^{2+} . Como mostrado na figura 18A, a expressão da SERCA2 estava reduzida nos corações das ratas Ovx em relação as Sham ($0,66 \pm 0,03$ vs $1,03 \pm 0,06$, $p < 0,05$); e esta redução na SERCA2 foi evitada pelo TF (Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$). Por outro lado, a expressão proteica do PLB estava aumentada no grupo Ovx em comparação ao Sham ($p < 0,05$) e o TF não foi capaz de prevenir este aumento ($p = 0,86$, Figura 18B).

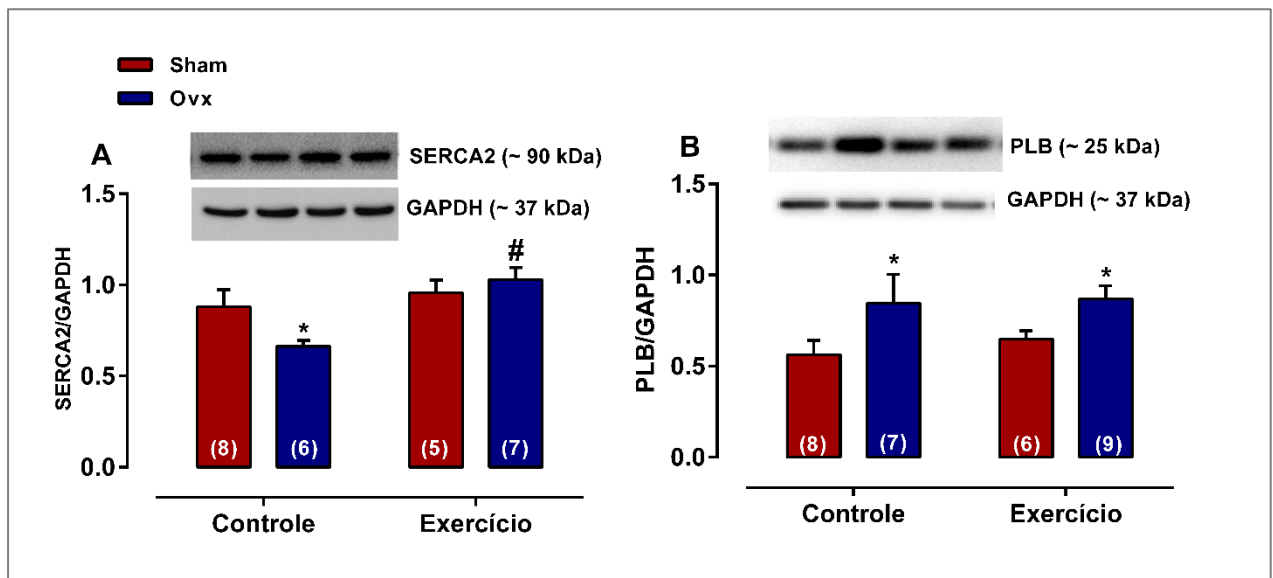


Figura 18. Expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ SERCA2 e PLB no ventrículo esquerdo de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia. **A e B**, Expressão proteica da SERCA2 e do fosfolambam total (PLB). Dados expressos como Média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs. ShamEx. O número de animais está indicado entre parênteses.

Adicionalmente, nós avaliamos a área de superfície das células dos cardiomiócitos isolados (Figura 19A). Um aumento na área de superfície dos cardiomiócitos foi observado nos grupos Ovx e OvxEx quando comparados aos grupos Sham e ShamEx. Achado semelhante foi encontrado em relação à massa cardíaca total no grupo Ovx (Tabela 1). A figura 19B, mostra imagens representativas de imunofluorescência para alfa-actinina.

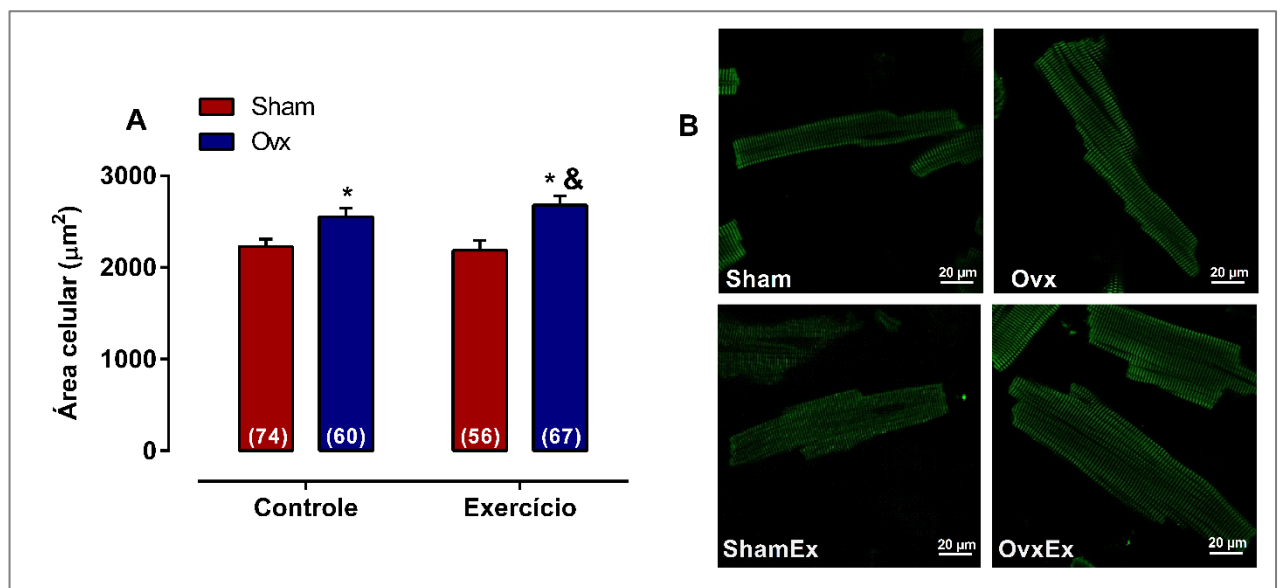


Figura 19. Área celular de cardiomiócitos de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia. **A**, Quantificação da área do cardiomiócito dos experimentos mostrados em B. **B**, Imagens representativas da imunofluorescência por alfa-actinina. Escala = 20 μm. Os números entre parênteses nos experimentos com o cardiomiócito isolado indicam o número de células de quatro animais de cada grupo. Dados expressos como Média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs. ShamEx.

4.3 Alterações estruturais em mitocôndrias induzidas pela ovariectomia

Após constatarmos alterações na contratilidade cardíaca de ratas submetidas à privação hormonal, nosso próximo passo foi investigar se estas alterações contráteis induziram modificações na estrutura/morfologia da mitocôndria, no coração.

Para caracterizar as mudanças nas subpopulações mitocondriais entre os grupos, primeiro avaliamos o número de mitocôndrias. Como mostrado na figura 20A, o número de mitocôndrias foi maior no grupo Ovx quando comparado ao Sham ($p < 0,01$). O TF foi efetivo em prevenir o aumento deste parâmetro, que foi semelhante entre OvxEx e Sham (Figura 20 A). A análise detalhada das dimensões mitocondriais mostrou uma redução significativa na área da seção transversal (Figura 20B), da subpopulação IFM no grupo Ovx. O TF impediu estas mudanças na morfologia mitocondrial induzida pela ovariectomia. A fim de investigar os mecanismos responsáveis pela alteração da morfologia mitocondrial; avaliamos a expressão proteica da isoforma 1 da mitofusina (Mfn-1), que está envolvida na regulação da fusão mitocondrial. A figura 20C mostra a expressão da Mfn-1. Nós encontramos uma diminuição na expressão da proteína Mfn-1 ($p < 0,05$) nos corações das ratas Ovx comparado ao Sham, o que não foi evitado pelo TF (Ovx vs OvxEx, $p = 0,82$).

As figuras 20D até 20K mostram as imagens representativas de mitocôndrias intermiofibrilares por meio da MET. A análise ultramicroscópica do tecido cardíaco, detectou a formação de pequenas mitocôndrias no grupo Ovx em relação ao Sham (Figuras 20D e 20E).

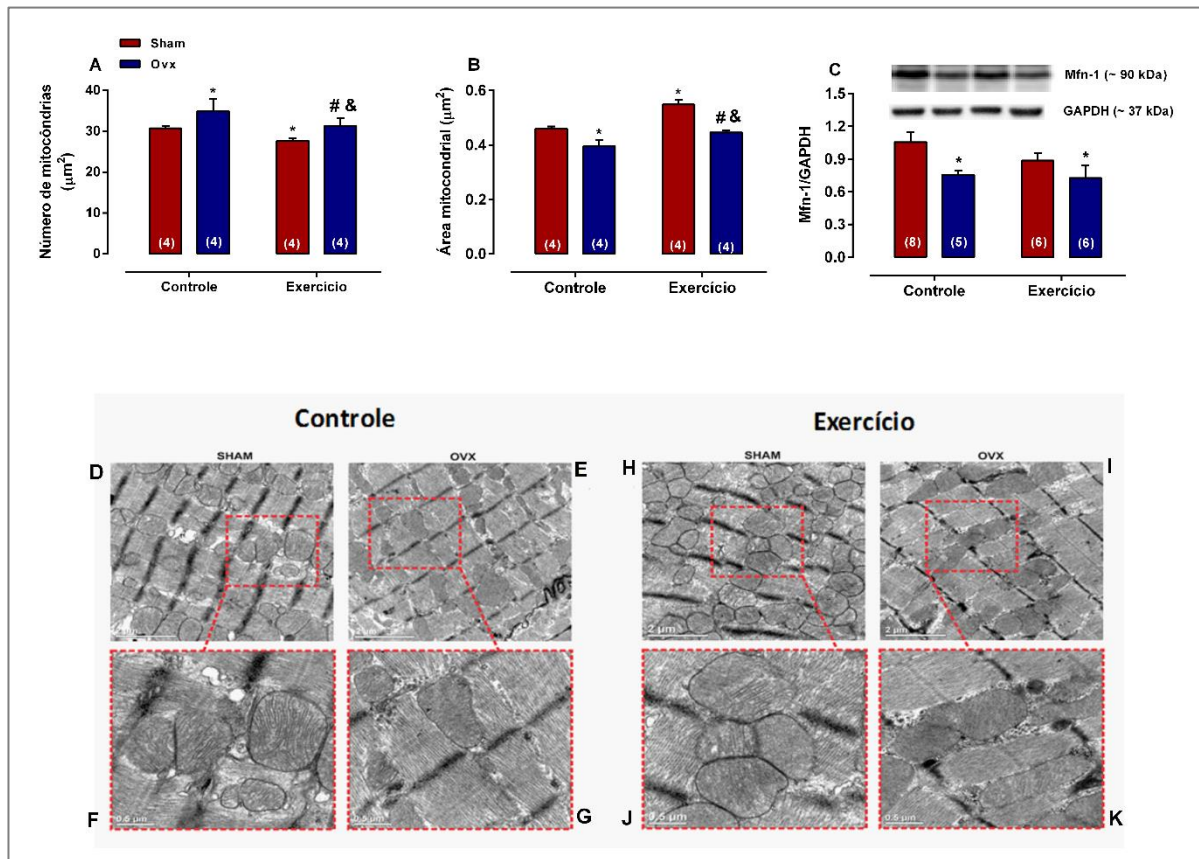


Figura 20. Treinamento físico aeróbico restaura as alterações morfológicas mitocondriais de ratas submetidas a privação de hormônios sexuais femininos após doze semanas de ovariectomia. **A**, Quantificação do número de mitocôndrias por microscopia eletrônica de transmissão (MET). **B**, Área por mitocôndria individual medida por MET de 4 animais por grupo. **C**, Expressão proteica da Mfn-1. **D**, Imagens representativas da subpopulação intermiofibrilar mitocondrial por MET do Sham. **E**, do Ovx. **H**, do ShamEx e **I**, do OvxEx, a escala em **D**, **E**, **H** e **I** = 2 μm . **F**, Imagens ampliadas do Sham, **G**, Ovx, **J**, ShamEx e **K**, OvxEx. Escala em **F**, **G**, **J** e **K** = 0,5 μm . Dados expressos como Média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs. ShamEx. O número de animais está indicado entre parênteses.

4.4 Treinamento físico aeróbico e fosforilação oxidativa

Após a verificação da disfunção contrátil com consequente disfunção mitocondrial, nós avaliamos a fosforilação oxidativa da CTE.

A avaliação da respiração mitocondrial das subpopulações IFM e SSM foi avaliada por substratos específicos ao Complexo I e Complexo II da CTE (palmitoil-L-carnitina, glutamato + malato, piruvato + malato e succinato na presença do inibidor rotenona), que conhecidamente participam das funções respiratórias fisiológicas no tecido cardíaco.

Como mostrado na tabela 3, na presença de piruvato + malato, a taxa máxima de respiração mitocondrial (Estado 3) e a taxa de controle respiratório (índice de medida da capacidade máxima das mitocôndrias em aumentar a produção de ATP acima de valores basais em resposta à estimulação por ADP), não diferiram entre os grupos na subpopulação IFM. Embora não tenhamos encontrado nenhuma diferença no Estado 4 entre Sham e Ovx, houve uma tendência ao aumento no grupo Ovx ($p = 0,08$). Além disso, os animais ovariectomizados que realizaram treinamento físico apresentaram valores mais elevados de relação ADP:O quando comparados a Sham e Ovx (Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$) (Tabela 3A). Já na subpopulação SSM, o TF reduziu a taxa máxima de respiração mitocondrial (Estado 3) em ratas ovariectomizadas comparadas a seu controle (Ovx vs OvxEx, $p < 0,05$) e também reduziu o aumento no Estado 4 no grupo OvxEx ($p < 0,01$). O TF aumentou apenas a relação ADP: O no grupo OvxEx em relação aos grupos Sham e Ovx ($p < 0,05$). Não observamos diferenças nos valores de RCR na SSM (Tabela 3). Esses dados sugerem que a glicólise não é afetada pela ovariectomia ou pelo treinamento físico aeróbico, pois no coração, 60-90% do acetil-CoA vem da β -oxidação dos ácidos graxos, e 10-40% vem da oxidação do piruvato que é derivado em quantidades aproximadamente iguais da

glicólise, via oxidação do lactato. A via glicolítica converte glicose 6-fosfato e NAD^+ em piruvato e NADH e gera dois ATP para cada molécula de glicose. O NADH e o piruvato formados na glicólise são transportados para a matriz mitocondrial para gerar CO_2 e NAD^+ e completar o processo de glicólise a partir da oxidação aeróbica ou convertidos em lactato e NAD^+ no citosol (glicólise não oxidativa). Ambos os substratos (glutamato + malato e piruvato) são formados na etapa final da glicólise [170-174].

Tabela 3. Respiração mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons de ratas ovariectomizadas após doze semanas de treinamento físico aeróbico na presença dos substratos energéticos Piruvato + Malato.

	Sham	Ovx	ShamEx	OvxEx
IFM	(n = 8)	(n = 10)	(n = 5)	(n = 6)
Estado 3	225 ± 9	198 ± 11	234 ± 19	192 ± 18
Estado 4	68 ± 6	81 ± 5	66 ± 6	59 ± 5 [#]
RCR	3,8 ± 0,5	3,1 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,2
ADP:O	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3	3,9 ± 0,8	4,3 ± 0,6 ^{*#}
SSM	(n = 8)	(n = 8)	(n = 4)	(n = 6)
Estado 3	191 ± 8	195 ± 10	189 ± 16	163 ± 12 [#]
Estado 4	47 ± 2	66 ± 6 [*]	48 ± 6	49 ± 4 [#]
RCR	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,7	3,4 ± 0,2
ADP:O	4,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3	5,0 ± 1,0	5,8 ± 0,8 ^{*#}

Avaliação da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações isoladas intermiofibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM) de ventrículo esquerdo de ratas Sham, Ovx, ShamEx, e OvxEx. Respiração máxima no Estado 3 (na presença de ADP); respiração máxima no Estado 4; RCR, Razão controle respiratório (Estado 3/Estado 4); ADP:O, razão fosfato inorgânico/oxigênio. Taxas respiratórias expressas em nanomol

de oxigênio/min/mg de proteína. Dados expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs Sham. # $p < 0,05$ vs Ovx. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais está indicado entre parênteses.

A atividade do Complexo II foi medida a partir do substrato succinato e do inibidor rotenona (Tabela 4). Na IFM, nenhuma diferença entre os grupos foi observada para o Estado 3, Estado 4 e RCR (Tabela 4). Apenas para a razão ADP:O foram detectadas diferenças nos grupos exercitados (ShamEx e OvxEx) em comparação ao Sham e a Ovx (Sham vs ShamEx, $p < 0,05$ e Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$) (Tabela 4). Na subpopulação SSM, o Estado 3 foi maior no grupo ShamEx em relação ao Sham, respectivamente (327 ± 23 vs 270 ± 13 nmol O₂.mg⁻¹.min⁻¹, $p < 0,05$) enquanto o Estado 4 foi maior no grupo Ovx comparado ao Sham (130 ± 5 vs 104 ± 6 nmol O₂.mg⁻¹.min⁻¹, $p < 0,01$). O TF foi efetivo ao prevenir o aumento do Estado 4 e a redução da razão ADP:O induzida pela ovariectomia (Tabela 4), sugerindo que a ovariectomia induziu o desacoplamento mitocondrial na subpopulação SSM e o treinamento físico preveniu essas alterações.

Tabela 4. Respiração mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons de ratas ovariectomizadas após doze semanas de treinamento físico aeróbico na presença do substrato energético Succinato.

	Sham	Ovx	ShamEx	OvxEx
	(n = 9)	(n = 10)	(n = 7)	(n = 6)
IFM				
Estado 3	313 ± 17	315 ± 18	308 ± 26	317 ± 18
Estado 4	130 ± 8	147 ± 6	134 ± 8	127 ± 10
RCR	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2
ADP:O	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2	3,0 ± 0,4* [#]	2,7 ± 0,08 [#]
SSM	(n = 10)	(n = 12)	(n = 5)	(n = 5)
Estado 3	270 ± 13	301 ± 15	327 ± 23*	287 ± 16
Estado 4	104 ± 6	130 ± 5*	100 ± 9 [#]	86 ± 7 [#]
RCR	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2
ADP:O	2,0 ± 0,16	1,5 ± 0,12*	2,0 ± 0,17	2,0 ± 0,2 [#]

Avaliação da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações isoladas intermiofibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM) de ventrículo esquerdo de ratas Sham, Ovx, ShamEx, e OvxEx. Respiração máxima no Estado 3 (na presença de ADP); respiração máxima no Estado 4; RCR, Razão controle respiratório (Estado 3/Estado 4); ADP:O, razão fosfato inorgânico/oxigênio. Taxas respiratórias expressas em nanomol de oxigênio/min/mg de proteína. Dados expressos como Média ± EPM. * $p < 0,05$ vs Sham. [#] $p < 0,05$ vs Ovx. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais está indicado entre parênteses.

Ainda para compreender as possíveis alterações induzidas pela Ovx sobre a CTE, nós avaliamos o “shuttle” do aspartato a partir da utilização dos substratos Glutamato + Malato para geração de NADH (fonte do elétron para o Complexo I). Não foram observadas diferenças para o Estado 3 entre os grupos nas subpopulações IFM e SSM (Figura 21A e 21C). Contudo, observamos aumento do Estado 4 em ambas

subpopulações no grupo Ovx em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$) (Figuras 21B e 21D). O TF foi capaz de prevenir o aumento no Estado 4 induzido pela Ovx em ambas as subpopulações no grupo OvxEx ($p < 0,01$). Estes dados demonstram que a ovariectomia não afeta a oxidação do substrato, mas induz o desacoplamento da CTE mitocondrial em ambas as subpopulações, principalmente na IFM.

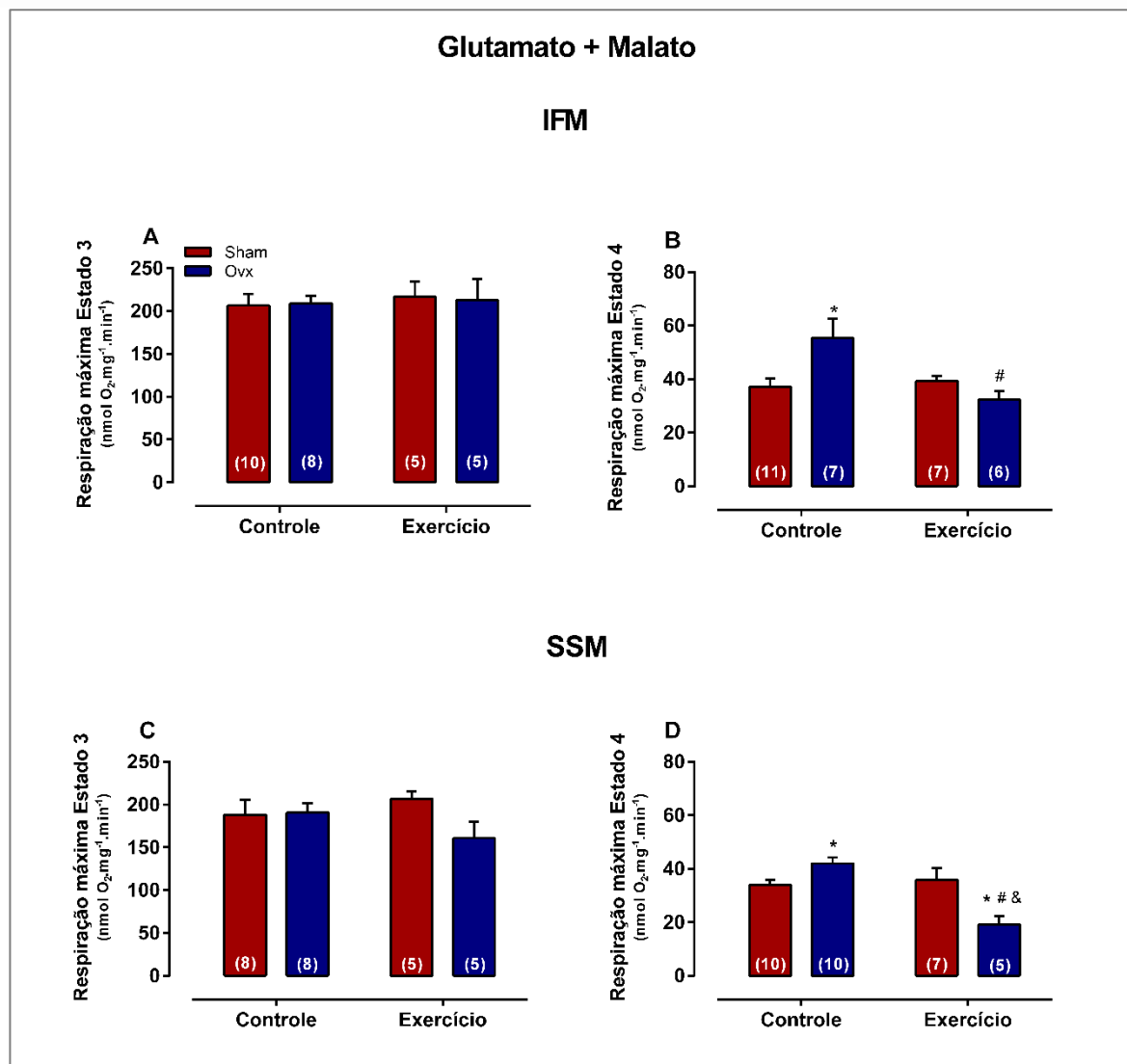


Figura 21. Respiração mitocondrial das subpopulações isoladas do ventrículo esquerdo na presença dos substratos energéticos Glutamato + Malato. **A e B**, Respiração máxima dos Estados 3 e 4 na mitocôndia intermiofibrilar (IFM) para o complexo I. **C e D**, Respiração máxima dos Estados 3 e 4 na mitocôndia subsarcolemal (SSM) para o complexo I. Dados expressos como média \pm EPM e,

comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs. ShamEx.

Em seguida, nós avaliamos a β -oxidação a partir da presença do substrato específico Palmitoil-L-carnitina. O Estado 3 estava diminuído em ambas as subpopulações mitocondriais (IFM e SSM) no grupo Ovx comparado ao grupo Sham ($p < 0,01$) (Figuras 22A e 22C). O TF foi capaz de prevenir esta diminuição no Estado 3 na IFM (Ovx vs OvxEx), mas não foi efetivo na SSM (IFM: $183,8 \pm 7,8$ vs $130,4 \pm 7,4$, $p < 0,01$; SSM: $166,2 \pm 9,5$ vs $136,4 \pm 11,4$, $p = 0,15$) (Figuras 22A e 22C, respectivamente). Na IFM, foi observado um aumento no Estado 4 no grupo Ovx em relação ao grupo Sham ($p < 0,01$) (Figura 22B). Além disso, na SSM o Estado 4 estava diminuído no grupo OvxEx quando comparado ao Ovx ($p < 0,05$) (Figura 22D). Como observado, houve uma melhora na bioenergética mitocondrial nos grupos exercitados, especificamente com a palmitoil-L-carnitina. O coração adulto normalmente obtém de 50 a 70% de seu ATP a partir de ácidos graxos e essas alterações na oxidação desses ácidos podem ter consequências energéticas e funcionais significativas no coração.

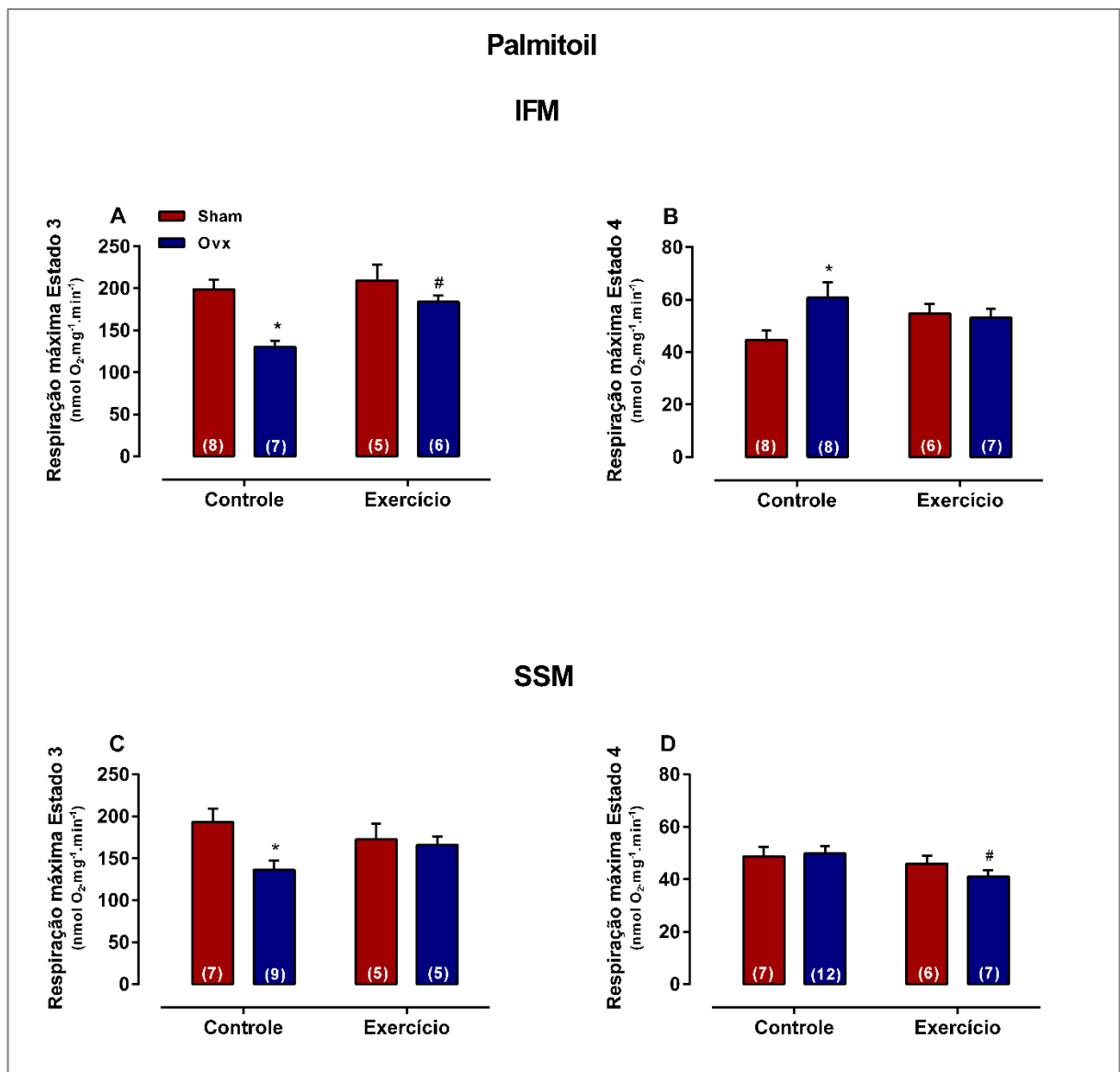


Figura 22. Respiração mitocondrial das subpopulações isoladas do ventrículo esquerdo com o substrato energético Palmitoil. Avaliação da β -oxidação. **A** e **B**, Respiração máxima dos Estados 3 e 4 na mitocôndria intermiofibrilar (IFM). **C** e **D**, Respiração máxima dos Estados 3 e 4 na mitocôndria subsarcolemal (SSM). Dados expressos como média \pm EPM e, comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. OvX. & $p < 0,05$ vs. ShamEx.

Para confirmar se, além desses resultados obtidos na função respiratória mitocondrial, os complexos respiratórios da CTE estariam aumentados, nós avaliamos a expressão proteica dos complexos da CTE pela técnica de Western Blotting (Figuras

23A e 23B). Conforme mostrado na figura 23A, na IFM, a expressão proteica do complexo I estava diminuída no grupo Ovx quando comparado ao grupo Sham ($p < 0,05$). O grupo treinado não mostrou melhora deste parâmetro ($p = 0,07$). Também observamos uma diminuição no complexo IV no grupo Ovx em relação ao Sham ($p < 0,05$) e o TF sendo capaz de restaurar esta redução a níveis semelhantes ao grupo Sham (Ovx vs OvxEx, $p < 0,04$). Também não observamos nenhuma diferença no complexo III no grupo Ovx quando comparado ao Sham ($p = 0,06$). Para os complexos II e V, nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada (Figura 23A). Na subpopulação SSM, foi encontrado apenas uma redução no complexo II no grupo OvxEx em relação ao Sham ($p < 0,05$) (Figura 23B). Estes dados nos levam à conclusão de que, embora a expressão proteica da CTE esteja reduzida, os dados funcionais indicam que a oxidação/fosforilação mitocondrial não é alterada com substratos para o Complexo I e II. No entanto, pode ser possível que esta redução na expressão de proteínas dos complexos possa afetar a função mitocondrial após um período mais longo. Em conjunto, esses dados apontam o TF como um importante modulador positivo da função mitocondrial cardíaca.

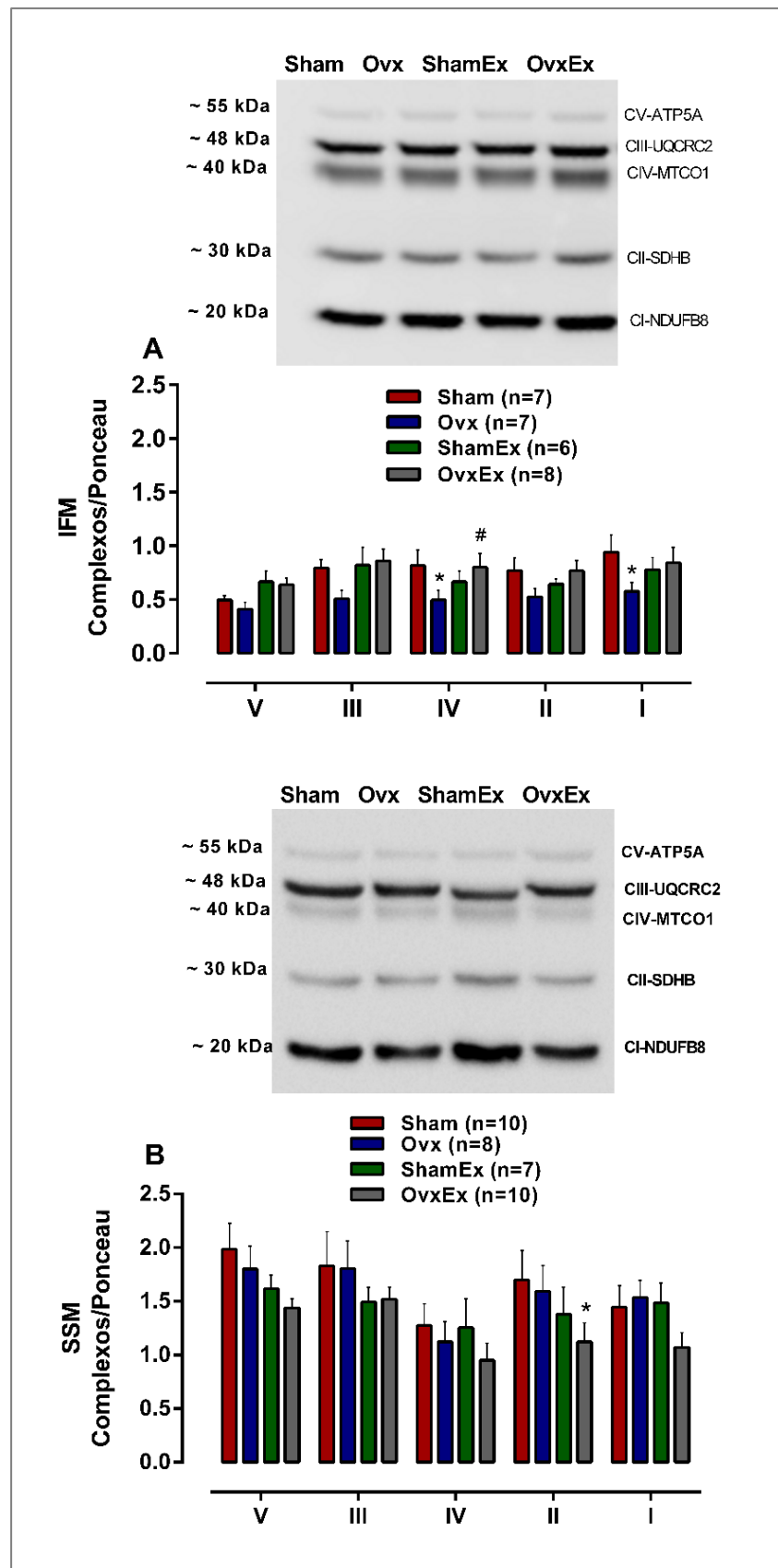


Figura 23. Expressão proteica dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (OXPHOS) das subpopulações mitocondriais isoladas Intermiofibrilar (IFM) e Subsarcolemal (SSM) dos grupos

Sham, Ovx, ShamEx e OvxEx. Dados expressos como média \pm EPM e, comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs. ShamEx.

4.5 Treinamento físico aeróbico induz alterações importantes na capacidade de retenção de cálcio mitocondrial

A partir da avaliação da função respiratória mitocondrial cardíaca da CTE nas subpopulações isoladas, intermiofibrilar e subsarcolemal, em sequência realizamos o ensaio fluorimétrico para avaliarmos a abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial utilizando o ensaio de captação máxima de Ca^{2+} , que é baseado em adições subsequentes em concentrações cumulativas do íon, sendo este reconhecido por um fluoróforo (*Calcium Green*). Foram realizados dois métodos estabelecidos para avaliar a PTPM induzida por Ca^{2+} em mitocôndrias do VE.

A PTPM foi avaliada a partir do *Swelling* mitocondrial induzido pela $[\text{Ca}^{2+}]$ elevada e refletido pela diminuição da absorbância a 540 nm após a adição de Ca^{2+} nas mitocôndrias isoladas. A determinação da absorbância inicial antes da adição de Ca^{2+} foi realizada para determinar os valores basais. Duas concentrações diferentes de Ca^{2+} foram usadas para avaliar a tolerância mitocondrial ao Ca^{2+} (100 nmol ou 500 nmol Ca^{2+} /mg proteína). Houve uma diminuição na absorbância com adição de 100 nmol ou 500 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína em todos os grupos, mas não foram observadas diferenças na tolerância mitocondrial ao Ca^{2+} para ambas as subpopulações isoladas (dados não mostrados). A capacidade de retenção de cálcio mitocondrial nas subpopulações de IFM e SSM foi avaliada a partir da medida da capacidade das mitocôndrias isoladas reterem o Ca^{2+} adicionado.

Para avaliar a captação de cálcio e abertura do poro mitocondrial entre os grupos estudados, a mitocôndria foi novamente incubada em um tampão cálcio *free*

na presença do marcador de cálcio. Nós observamos uma maior sensibilidade a PTPM induzida por Ca^{2+} tanto na subpopulação IFM quanto na SSM de ratas ovariectomizadas quando comparadas ao grupo Sham, refletindo uma $[\text{Ca}^{2+}]$ extra-mitochondrial mais alta para uma dada carga cumulativa de Ca^{2+} . Além disso, o TF aumentou significativamente a capacidade de retenção de Ca^{2+} no grupo OvxEx quando comparado ao Sham na IFM. Comportamento semelhante foi observado na SSM, onde o TF restaurou a capacidade de retenção de Ca^{2+} para o nível do Sham (Figuras 24A e 24B). Estes dados nos levam à conclusão de que as mitocôndrias de ratas ovariectomizadas tem menor capacidade de retenção de cálcio para uma dada carga cumulativa de Ca^{2+} .

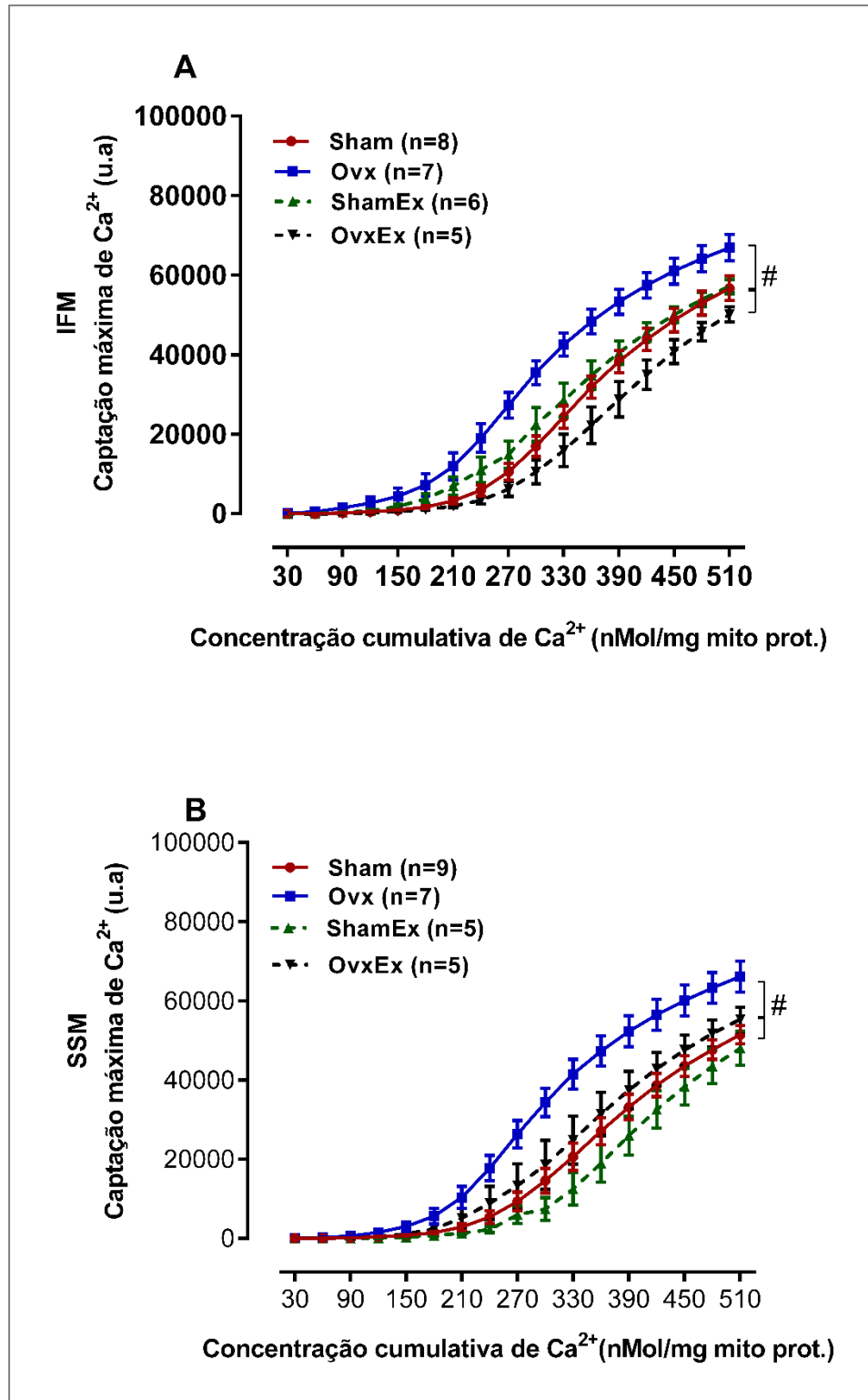


Figura 24: O treinamento físico aeróbico restaura a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial induzida pela privação de hormônios sexuais femininos após doze semanas de ovariectomia. **A**, Capacidade de retenção de cálcio na subpopulação intermiofibrilar (IFM) e **B**, Capacidade de retenção de cálcio na subpopulação subsarcolemal (SSM) de mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de ratas Sham, Ovx, ShamEx e OvxEx. As mitocôndrias foram preparadas para abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) com exposição progressiva a 25 nmol

[Ca²⁺]/ mg de proteína mitocondrial foi injetada a cada 7 min, e captação máxima de Ca²⁺ foi registrada a cada 2 segundos usando 750 nM de *Calcium Green-5N*. Dados expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. O número de animais está indicado entre parênteses.

Sabendo que a mitocôndria apresenta importante papel no tamponamento do Ca²⁺ e que prejuízos no transiente de Ca²⁺ são geralmente observados durante a disfunção cardíaca [95, 175, 176], questionamos se a capacidade reduzida de retenção de Ca²⁺ pela mitocôndria no grupo Ovx estaria associada ao desequilíbrio da homeostase do íon na organela, causando falhas na maquinaria contrátil cardíaca. Com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na capacidade de retenção do cálcio, avaliamos por meio da técnica de *Western blotting* a expressão proteica do canal uniporter mitocondrial (MCU) e da ciclofilina D (CypD) em mitocôndrias isoladas dos diferentes grupos estudados. A via predominante de influxo de Ca²⁺ na mitocôndria é pelo MCU. Na subpopulação IFM, a expressão proteica do MCU estava aumentada em ambos os grupos exercitados em relação aos seus controles (Sham vs ShamEx, $p < 0,05$ e Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$) (Figura 25A). Contudo, na SSM, nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 25B). Estes dados sugerem que o estímulo hipertrófico (fisiológico) para aumentar o trabalho cardíaco é caracterizado por um aumento similar na disponibilidade de proteínas que formam o canal uniporter.

Por outro lado, observamos um aumento expressivo no conteúdo protéico da CypD na IFM no grupo Ovx em relação ao grupo Sham ($p < 0,01$), com o exercício sendo efetivo em restaurar essa superexpressão ao nível do grupo Sham (Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$) (Figura 25C), enquanto nenhuma alteração foi detectada no conteúdo de proteína da CypD na subpopulação -SSM (Figura 25D). O aumento na expressão da CypD está ligado ao aumento da formação de PTPM, pois o cálcio se

liga a CypD para induzir a formação de PTPM. O aumento da CypD na subpopulação IFM de animais Ovx poderia explicar o aumento na formação dos poros mitocondriais.

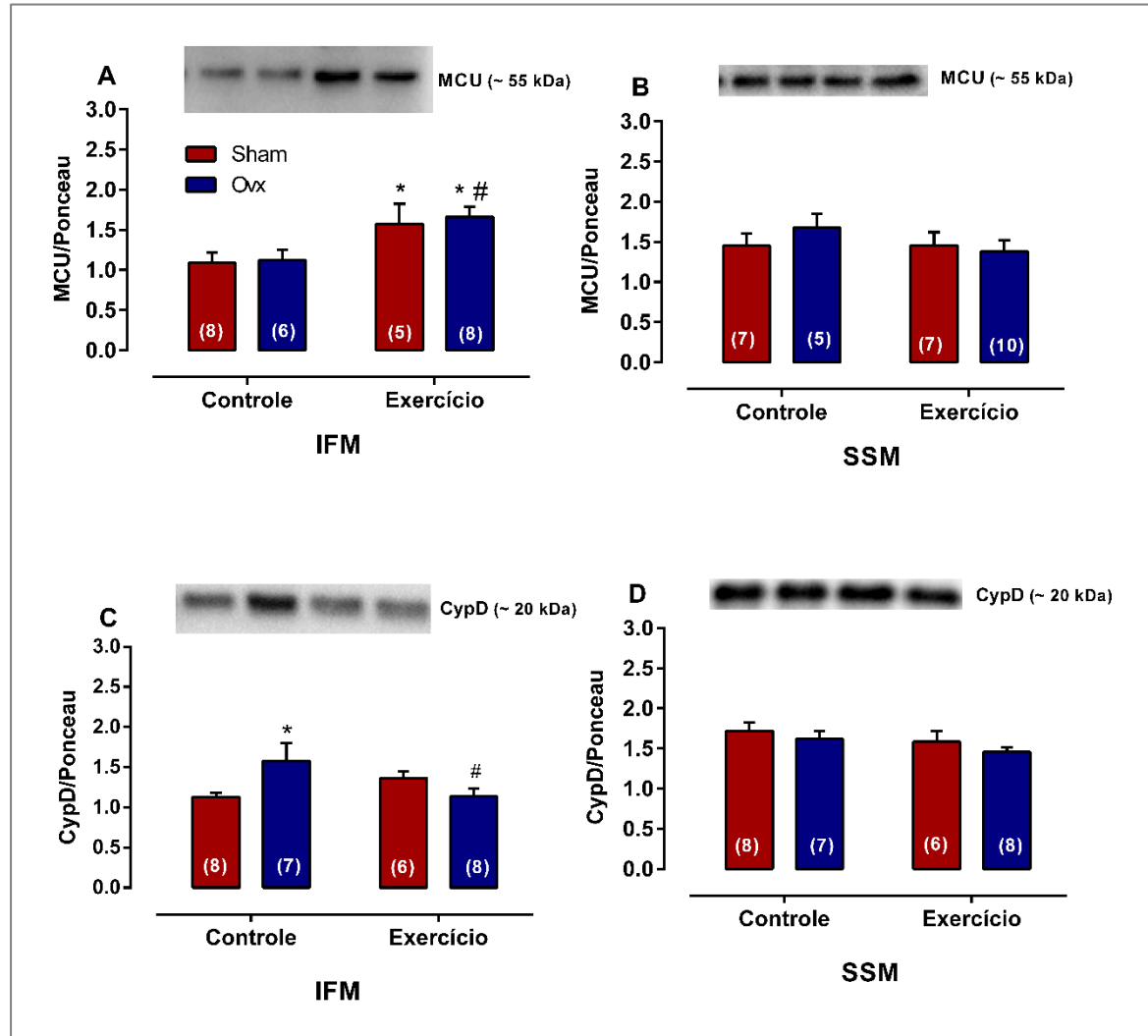


Figura 25. Expressão proteica do canal uniporter mitocondrial (MCU) e Ciclofilina D (CypD) das subpopulações mitocondriais isoladas do ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento físico aeróbico. **E** e **F**, Expressão proteica da Ciclofilina D (CypD) das subpopulações IFM e SSM, respectivamente. Dados expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. O número de animais está indicado entre parênteses.

4.6 O treinamento físico aeróbico melhora a via de sinalização da biogênese mitocondrial

Nossos dados demonstraram que animais ovariectomizados submetidos ao TF por 12 semanas, apresentaram melhora da regulação da função mitocondrial cardíaca. Parte desta melhora pode ser atribuída a uma melhor regulação da biogênese mitocondrial por meio de uma adaptação ao exercício físico praticado de forma regular. Assim, nosso próximo passo, foi investigar se a ovariectomia e/ou o treinamento físico aeróbico interferiram na via de sinalização da biogênese mitocondrial.

A melhoria da densidade e respiração mitocondrial, bem como a capacidade oxidativa máxima depende de fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK- α), coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1- α (PGC1- α), fator respiratório nuclear 1 (NRF -1) e fator de transcrição mitocondrial A (Tfam).

A proteína AMPK- α é bem conhecida como um sensor de energia e um regulador do metabolismo cardíaco. Quando avaliamos sua expressão, verificamos que os animais submetidos a ovariectomia apresentaram redução em seu conteúdo protéico em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$), ao passo que no grupo OvxEx em relação ao seu controle (Ovx vs OvxEx, $p < 0,002$), o TF foi capaz de restaurar estes valores (Figura 26A). De forma inesperada, a expressão desta proteína foi menor no grupo ShamEx quando comparado ao Sham ($p < 0,01$) (Figure 26A). Como a AMPK- α fosforila o PGC1- α para translocação para a mitocôndria, avaliamos os níveis de proteína do PGC-1 α . O PGC-1 α é uma proteína co-ativadora, uma classe de reguladores de transcrição que, embora, não se ligue ao DNA diretamente, também pode controlar programas de resposta gênica. O PGC-1 α auto regula sua própria

transcrição e se liga à região promotora de seus genes alvo como os fatores respiratórios nucleares 1 e 2 e estimula sua expressão. A figura 26B mostra que a ovariectomia induziu uma diminuição na expressão do PGC-1 α em relação ao grupo Sham ($p < 0,01$) que foi impedida pelo exercício no grupo OvxEx comparado ao seu controle ($p < 0,01$).

Seguindo a cascata de eventos da via de sinalização da biogênese mitocondrial, também foi avaliado o NRF-1 - fator de transcrição que trans-ativa genes codificadores nucleares codificando proteínas chave que regulam a transcrição e replicação do DNAm e proteínas destinadas à mitocôndria como o Tfam. Observamos uma redução do NRF-1 no grupo Ovx em comparação ao grupo Sham ($p < 0,01$) com valores restaurados no grupo Ovx exercitado ($p < 0,01$) (Figura 26C). Em seguida, avaliamos o conteúdo protéico do Tfam. O Tfam tem um importante papel para a replicação, transcrição e estrutura/organização do DNAm. Como mostrado nas figuras 26D e 26E, a expressão proteica do Tfam em ambas as subpopulações mitocondriais (IFM e SSM) estava reduzido no Ovx comparado ao Sham ($p < 0,01$) e restaurado no grupo Ovx exercitado a níveis semelhantes aos do grupo Sham (Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$). Além da expressão proteica do Tfam, também realizamos o ensaio de imunofluorescência para confirmar os níveis desta proteína e, como indicado na figura 26F, o TF evitou a redução nos níveis de Tfam. Embora o Tfam seja reconhecido como fator de transcrição específico do DNAm, ele também regula a transcrição do DNA nuclear, ou seja, o gene da SERCA2, que é reduzido em animais ovariectomizados. A diminuição da regulação do Tfam tem sido implicada na disfunção mitocondrial e cardíaca. Em conjunto, a diminuição dos fatores de transcrição mitocondrial pode ser responsável pela disfunção cardíaca em animais ovariectomizados.

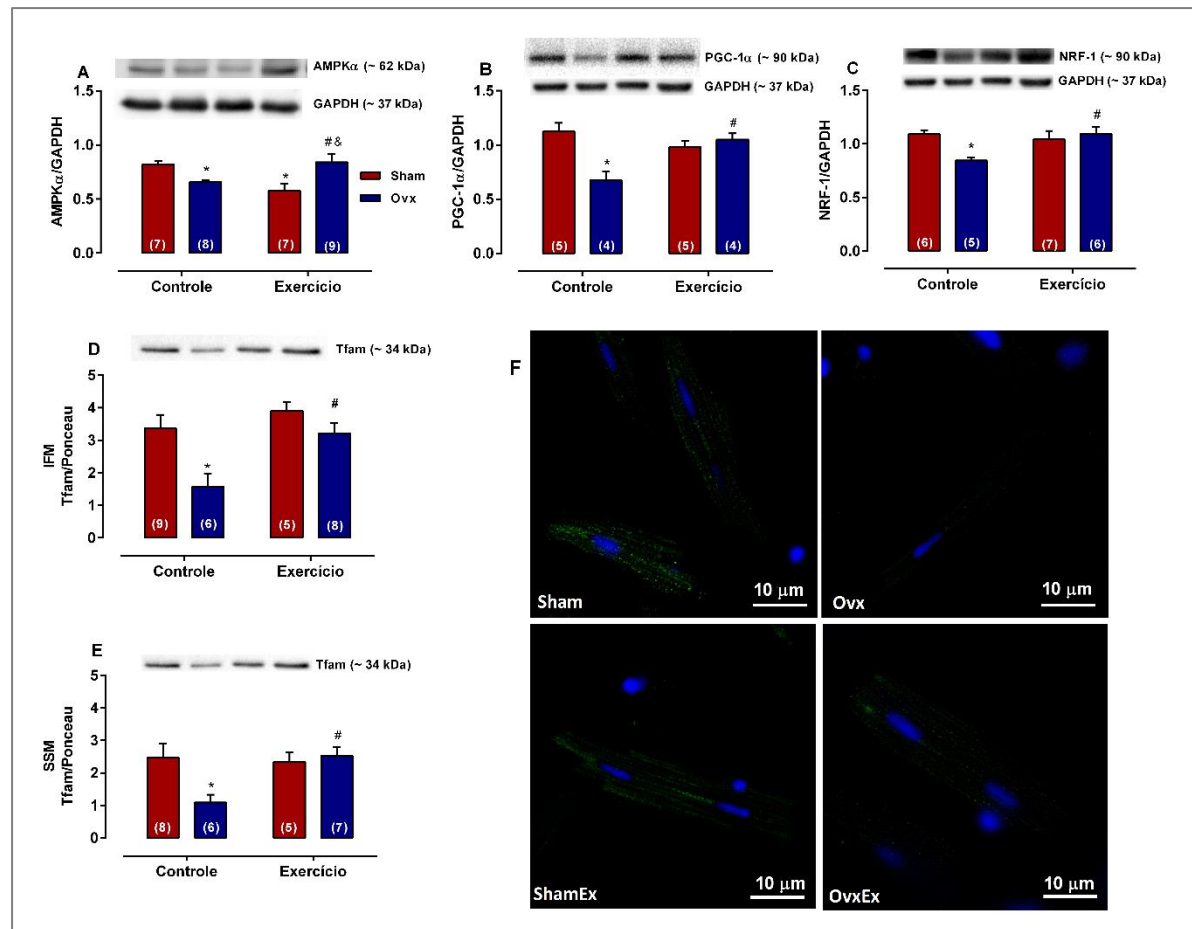


Figura 26. O treinamento físico aeróbico melhora a bioenergética mitocondrial de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia. Expressão proteica por meio da técnica de *Western Blotting* da AMPK-α **A**, PGC1-α **B**, NRF-1 **C**, do lisado cardíaco de ventrículo esquerdo. **D** e **E**, Expressão proteica do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) das subpopulações isoladas intermiofibrilar e subsarcolemal, respectivamente. **F**, Imagens representativas da imunofluorescência do Tfam nos grupos Sham, Ovx, ShamEx e OvxEx. Escala = 10 μm. Dados expressos como média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs ShamEx. O número de animais está indicado entre parênteses.

4.7 A ovariectomia aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de ânion superóxido mitocondrial

Para completar as análises funcionais no lisado cardíaco e na mitocôndria cardíaca isolada, avaliamos a expressão das proteínas cardíacas e mitocondriais envolvidas na formação de EROs.

Já está bem estabelecido que a NADPH oxidase transfere um elétron para o oxigênio molecular para formar ânion superóxido. Nós avaliamos o papel das isoformas da NADPH oxidase (isoformas 1, 2 e 4) e da produção mitocondrial de EROs. Entre todas as subunidades da NADPH oxidase, somente na NOX-4 foi encontramos aumento na sua expressão no grupo Ovx comparado ao grupo Sham com o treinamento físico restaurando este aumento para valores semelhantes aos encontrados no grupo Sham ($p < 0,01$) (Figura 27C).

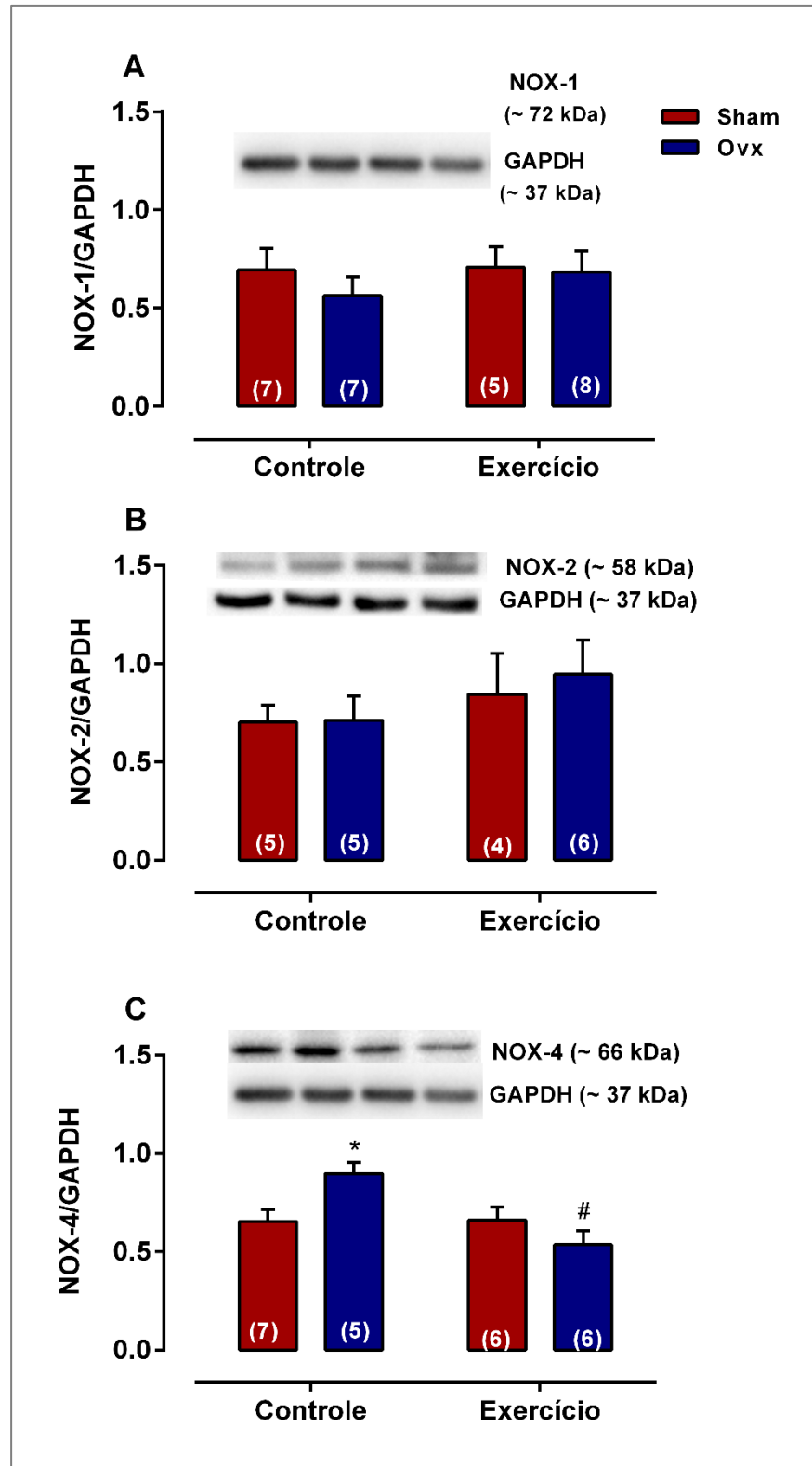


Figura 27. Treinamento físico aeróbico melhora o estresse oxidativo de cardiomiócitos isolados de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia. **A, B e C,** Expressão proteica por meio da técnica de *Western Blotting* das subunidades da NADPH Oxidase NOX-1, NOX-2 e NOX-4 no lisado cardíaco de ventrículo esquerdo. Dados expressos como média \pm EPM. Os

dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. O número de animais está indicado entre parênteses.

Considerando que a produção de EROs tem sido fortemente associada a mudanças no consumo de oxigênio e na disfunção mitocondrial, medimos a produção de ânion superóxido mitocondrial em cardiomiócitos isolados incubados com MitoSOX. Este marcador permeia as células vivas, onde seletivamente atinge as mitocôndrias. É rapidamente oxidado pelo superóxido, mas não por outras espécies reativas de oxigênio. O grupo Ovx apresentou um aumento de O_2^- mitocondrial quando comparado ao Sham ($p < 0,01$) e o TF restaurou a homeostase redox, reduzindo o estresse oxidativo (Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$) (Figuras 28A e 28B). Esse padrão reforça os resultados encontrados na mitocôndria cardíaca isolada e confirmam os benefícios de um programa de treinamento físico aeróbico na manutenção da homeostase redox na disfunção mitocondrial.

Além da medida da produção de ânion superóxido mitocondrial, avaliamos em seguida o estresse oxidativo por meio da análise da carbonilação de proteínas no lisado mitocondrial cardíaco isolado, uma vez que o acúmulo desses compostos pode formar agregados proteicos que levam a uma série de efeitos deletérios na célula. Como mostrado nas figuras 28C e 28D, a ovariectomia aumentou a carbonilação da proteína mitocondrial em ambas as subpopulações (IFM e SSM) comparada ao grupo Sham ($p < 0,05$). No entanto, apenas na IFM, o treinamento físico foi capaz de evitar a carbonilação de proteínas no grupo OvxEx em relação ao seu controle (Ovx vs OvxEx, $p < 0,01$) (Figura 28D).

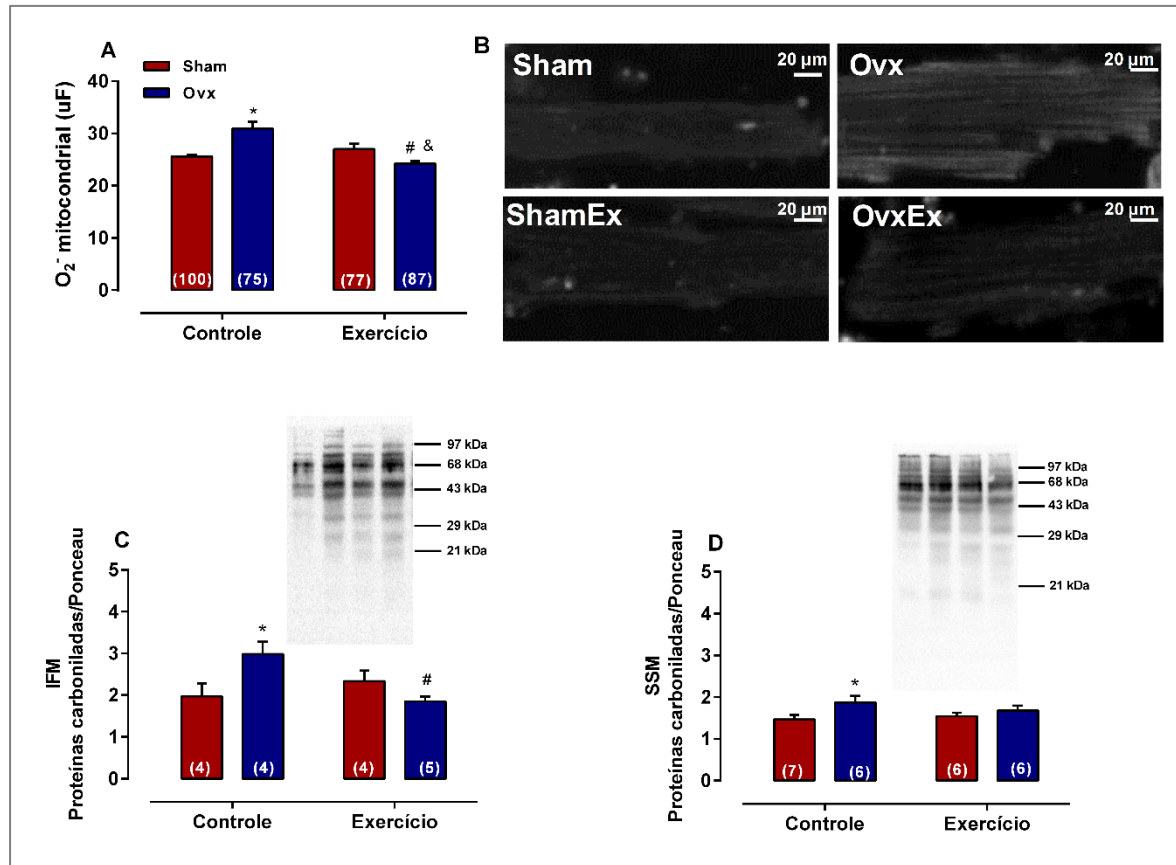


Figura 28. Treinamento físico aeróbico melhora o estresse oxidativo de cardiomiócitos isolados de ratas submetidas a privação hormonal após doze semanas de ovariectomia. **A**, Produção de ânion superóxido mitocondrial em cardiomiócitos incubados com MitoSOX. **B**, Imagens representativas da fluorescência cardiomiócitos incubados com MitoSOX nos grupos Sham, Ovx, ShamEx e OvxEx. Escala = 20 μ m. **C** e **D**, Expressão das proteínas carboniladas nas subpopulações IFM e SSM, respectivamente. Dados expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs ShamEx. Para o ensaio do MitoSOX foram utilizadas células de cardiomiócitos isolados de 4 corações por grupo. O número de animais está indicado entre parênteses.

Uma vez que a homeostasia redox é determinada pelo equilíbrio entre as vias pró e antioxidantes, atenção também deve ser dada aos mecanismos responsáveis pela defesa antioxidante intracelular, que conta com importante ação das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD). Para analisar a defesa antioxidante, nós medimos a expressão proteica das enzimas SOD manganês (Mn-SOD) - uma segunda isoforma da superóxido dismutase - e a catalase, ambas investigadas no lisado mitocondrial isolado (IFM e SSM). Quando medimos a expressão proteica mitocondrial da Mn-SOD e da catalase, em ambas subpopulações, estas enzimas estavam diminuídas no grupo Ovx em comparação ao grupo Sham ($p < 0,01$) e esta redução foi evitada nos grupos exercitados (Ovx vs OvxEx, $p < 0,05$) (Figuras 29A, 29B, 29C e 29D). A diminuição da Mn-SOD e da catalase pode estar implicada no aumento do acúmulo de EROs nas mitocôndrias.

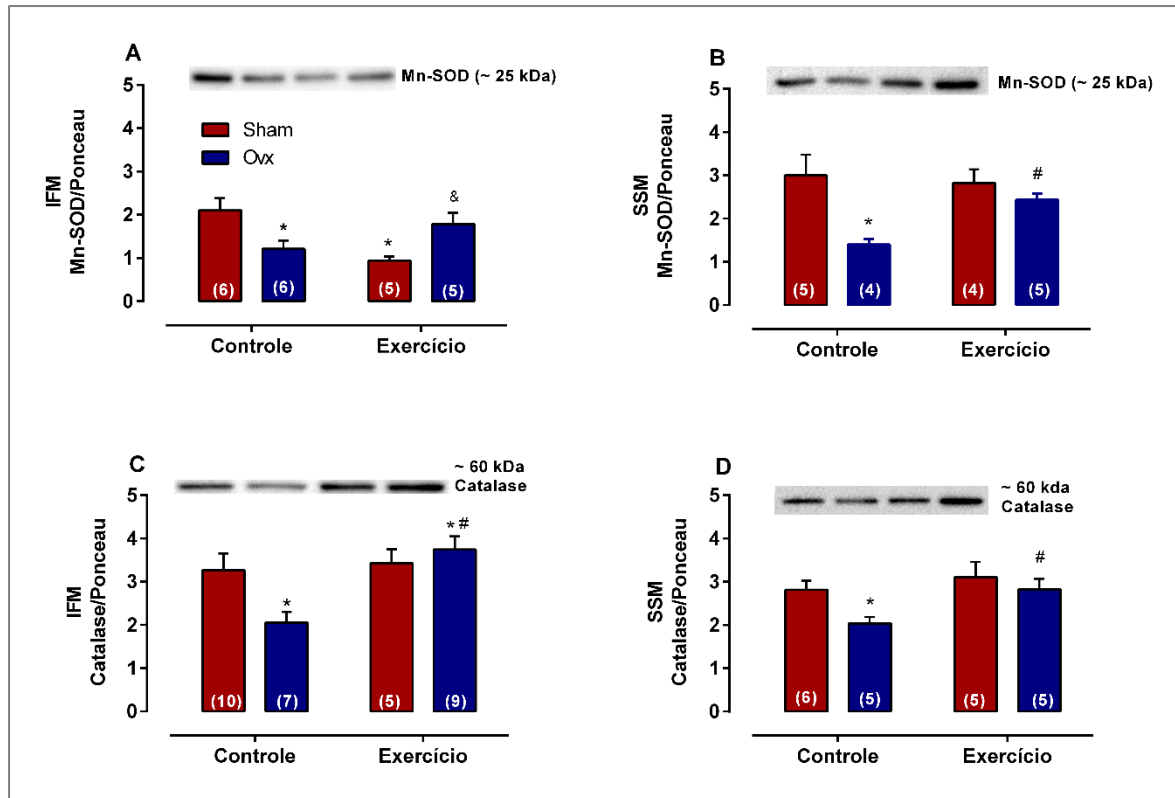


Figura 29: Treinamento físico aeróbico restaura a expressão proteica das enzimas antioxidantes mitocondriais de ratas após doze semanas de ovariectomia. **A** e **B**, Expressão proteica por meio da

técnica de *Western Blotting* da Superóxido dismutase mangânes (Mn-SOD) nas subpopulações mitocondriais isoladas de ventrículo esquerdo Intermiofibrilar (IFM) e Subsarcolemal (SSM), respectivamente. **C** e **D**, Expressão proteica da Catalase nas subpopulações IFM e SSM, respectivamente, dos grupos Sham, Ovx, ShamEx e OvxEx. Dados expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$ vs. Sham. # $p < 0,05$ vs. Ovx. & $p < 0,05$ vs ShamEx. O número de animais está indicado entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de doze semanas de treinamento físico aeróbico sobre a contratilidade e a bioenergética cardíaca em um modelo de privação de hormônios sexuais femininos em ratas. Nossos resultados mostraram diminuição da contratilidade cardíaca, aliada às alterações na função e morfologia mitocondriais, fatores que contribuíram para o processo de disfunção mitocondrial cardíaca. Neste sentido, o treinamento físico aeróbico mostrou-se eficaz em restaurar/prevenir:

- 1) a disfunção contrátil cardíaca
- 2) a expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no VE
- 3) a disfunção e as alterações morfológicas nas subpopulações mitocondriais cardíacas isoladas
- 4) a eficiência da oxidação de substratos energéticos nas subpopulações mitocondriais cardíacas isoladas
- 5) a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial
- 6) a via da biogênese mitocondrial cardíaca
- 7) a produção de ânion superóxido mitocondrial cardíaca
- 8) a produção de radicais livres nas subpopulações mitocondriais cardíacas intermiofibrilar e subsarcolemal

A mortalidade por doença cardíaca normalmente é maior em homens, tornando-se semelhante em mulheres e homens após o período da menopausa. Todavia, mulheres com doença cardíaca tem pior prognóstico do que homens. Por

exemplo, a mortalidade por infarto do miocárdio é mais do que 50% maior em mulheres [177, 178]. A perda de estrógenos após a menopausa aumenta o risco para doenças cardiovasculares, embora a carência de estrogênio seja insuficiente para explicar completamente o aumento do risco. Ensaios clínicos mostraram que a terapia de reposição foi associada com risco aumentado de eventos trombóticos/ateroscleróticos [179] e após a menopausa a taxa de aumento no risco de doença cardíaca é mais alta em mulheres [180]. Apesar dos avanços nos cuidados médicos e intervenções farmacológicas, a incidência e prevalência de doenças cardíacas ainda é alta [181]. Como uma alternativa, intervenções não farmacológicas como o exercício físico, emergiram nos últimos anos.

O TF está intimamente relacionado à capacidade de realização de esforço físico e consequente atenuação dos sintomas das DCV [182]. Dentre as adaptações mais comuns ao exercício físico podemos destacar a resposta vasodilatadora no endotélio vascular, na musculatura esquelética, na distribuição do débito cardíaco e na resposta ventilatória [183], assim como modificações estruturais e metabólicas na musculatura esquelética [184]. Como esperado, nossos resultados mostraram que o treinamento físico aeróbico aumentou a capacidade de corrida, avaliada através do teste de tolerância à fadiga e da velocidade máxima de corrida. Estes dados estão de acordo com estudos que apoiam a ideia de que o treinamento aeróbico causa adaptações cardíacas benéficas em animais normotensos [185-187]. No entanto, essas adaptações adquiridas com o TF regular são perdidas quando não há regularidade na prática de exercício [187, 188], o que explica as diferenças encontradas entre os animais sedentários e exercitados em nosso modelo.

A prática de exercícios aumenta a capacidade física e impede o ganho de peso e acúmulo de gordura visceral. Os exercícios aeróbicos podem constituir uma

interessante intervenção para controlar o peso corporal e acúmulo de gordura em mulheres pós-menopausa [189]. O aumento na adiposidade corporal também é um fator importante a ser observado, sendo relacionado ao aumento do risco de doença arterial coronariana após a menopausa. A alteração da distribuição de gordura nesse período leva a um aumento na resistência a insulina e incidência de diabetes, fato que eleva substancialmente o risco de DCV e morte [5].

Em nosso estudo, evidenciamos que o TF foi capaz de impedir o aumento significativo do peso corporal nos grupos exercitados. Resultado semelhante foi obtido para o somatório de gordura corporal. Estes achados estão de acordo com estudos experimentais que demonstraram que a deficiência estrogênica leva a um aumento substancial na adiposidade. Claudio et al. (2013) [190] e Endlich et al. (2013) [191], mostraram haver um aumento significativo no peso de gorduras de ratas, submetidas a remoção cirúrgica dos ovários, principalmente nos coxins retroperitoneal e parametrial. Em conformidade com esses resultados, estudos em mulheres na pós-menopausa demonstram um aumento da circunferência da cintura [192], assim como, um aumento nos depósitos de gordura abdominal, associados a uma redução da massa livre de gordura em mulheres na pré-menopausa, com a supressão dos hormônios ovarianos por meio de um agonista de hormônio liberador de gonadotrofinas [193].

Para além do papel central do exercício físico regular na melhora da capacidade de geração de ATP, representada pela melhora do acoplamento entre oxidação e fosforilação [194] no músculo esquelético e da função energética no tecido adiposo, está bem documentado a melhora da função cardíaca em diversas etiologias da doença, observada tanto em humanos [97], quanto em modelos experimentais [95, 96]. De fato, essa melhora decorre de alterações benéficas na musculatura cardíaca,

com efeito positivo do exercício físico no remodelamento cardíaco reverso. A regularidade da prática de exercícios promove redução na via de sinalização da calcineurina, relacionada à hipertrofia patológica [96] e nas proteínas relacionadas à fibrose cardíaca [195].

Neste estudo, detectamos hipertrofia cardíaca pelo aumento da área de superfície dos cardiomiócitos de ratas ovariectomizadas. De fato, esta observação foi previamente reportada por nosso grupo, demonstrando que a privação de hormônios induz hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno devido à ativação de receptor AT1 em cardiomiócitos [28]. Embora o treinamento físico aeróbico não tenha restaurado a hipertrofia cardíaca em ratas ovariectomizadas, há evidências de que o exercício atenua o aumento do receptor AT1 de angiotensina II dependente da idade [196], a atividade da renina e a concentração de angiotensina II, reduzindo portanto a hipertrofia no coração após infarto.

Os estrógenos desempenham um importante papel na função cardíaca e sua deficiência foi relatada na disfunção contrátil. Confirmando nossos achados anteriores [28, 29, 160], a privação de hormônios reduziu a contratilidade em ratas ovariectomizadas, o que foi prevenido pelo exercícios. Para elucidar os mecanismos envolvidos na homeostase do cálcio intracelular, nós medimos o transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados. Embora o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ não tenha sido diferente entre Sham e Ovx, parece que ratas ovariectomizadas são mais sensíveis ao exercício, porque o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foi maior nesse grupo. Carneiro-Junior et al. (2013) [164] mostraram que o treinamento aeróbico de baixa intensidade aumentou o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em machos após oito semanas, mas o mesmo resultado não foi alcançado pelo nosso grupo ShamEx. Os efeitos do treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade sobre a função de

cardiomiócitos isolados incluem melhora nas propriedades elétricas e contráteis tanto em ratos normotensos [185] quanto em hipertensos [188, 197]. Ainda, a literatura apontou melhora na função de cardiomiócitos isolados de ratas normotensas [198, 199] e camundongos fêmeas adultas [200] em resposta ao treinamento aeróbico de alta intensidade.

É conhecido que o retículo sarcoplasmático é responsável por aproximadamente 90% da remoção do Ca^{2+} durante o relaxamento no miócito ventricular de rato [201]. Consequentemente, o tempo de decaimento deve fornecer uma boa estimativa da taxa de captação de Ca^{2+} pelo RS. Nossos resultados mostraram uma taxa de decaimento significativamente menor em miócitos das ratas Ovx. Isso sugere uma reduzida atividade da Ca^{2+} -ATPase do RS nesse grupo, ou reduzida expressão proteica, o que poderia resultar em decréscimo no conteúdo de Ca^{2+} para o RS [201]. Para elucidar os mecanismos envolvidos na captação de Ca^{2+} pelo RS, nós conduzimos a análise da expressão proteica para SERCA2 e fosfolambam. A ovariectomia reduziu a expressão proteica de SERCA2, o que poderia ser responsável pelo aumentado tempo até o decaimento. Este resultado foi previamente reportado por Bupha-Intr et al.(2009) [202] e por nosso grupo [28, 160]. Adicionalmente, a expressão proteica do fosfolambam foi aumentada nas ratas Ovx, o que indicou que a atividade Ca^{2+} -ATPase do RS estava reduzida. Inesperadamente, o TF não restaurou a expressão proteica do fosfolambam. Um ponto interessante é que o TF não aumentou a expressão proteica da β -SERCA2 em ratas Sham, mas aumentou nas ovariectomizadas. Carneiro-Junior et al. (2013) [164] demonstraram que ratos submetidos a oito semanas de treinamento com exercícios aeróbicos tiveram expressão aumentada de SERCA2 e nenhuma alteração na expressão de fosfolambam, embora a fosfolambam fosforilada na Ser¹⁶ tenha sido aumentada. Por

outro lado, Bupha-Intr et al. (2009) [202] também demonstraram que ratas submetidas a nove semanas de treinamento não aumentaram a expressão de SERCA2. Além disso, Bupha-Intr et al. (2009) [202] também mostraram que animais Ovx tiveram expressão proteica e atividade de SERCA2 restauradas após o período de treinamento, o que corrobora nossos achados.

Considerando haver uma íntima conexão entre a contratilidade miocárdica e metabolismo oxidativo, nós avaliamos posteriormente a função mitocondrial. A demanda cardíaca por energia não está somente relacionada à morfologia mitocondrial, mas também à sua organização estrutural. Devido à alta demanda por ATP, cardiomiócitos adultos apresentam alta densidade mitocondrial quando comparados a outros tecidos.

A piora da função mitocondrial de forma tempo-dependente resultante da privação de hormônios sexuais femininos [154-156], bem como a deficiência de estrógenos afeta a dinâmica mitocondrial, não está bem esclarecido. Nós observamos que a ovariectomia reduziu a quantidade de mitocôndrias intermiofibrilares e, o TF foi capaz de restaurá-las ao nível do grupo Sham. Além disso, a ovariectomia também aumentou a fragmentação mitocondrial que foi seguida pela redução na expressão proteica da mitofusina 1 (Mfn1). Corroborando esses achados, Papanicolaou et al. (2011) [203] mostraram que a redução na expressão do Mfn1 foi associada à fragmentação mitocondrial. A reduzida expressão de Opa1 e Mfn1, foi suficiente para produzir um fenótipo de fragmentação mitocondrial. É conhecido que o Mfn1 é regulado por PGC-1 α através do receptor relacionado ao estrogênio no coração. Somados, esses resultados nos levaram a acreditar que a fragmentação mitocondrial induzida pela privação de hormônios poderia ocorrer devido a reduzida expressão proteica de PGC-1 α e Mfn1 no coração das ratas ovariectomizadas. Adicionalmente,

os sítios de reconhecimento de NRF nos promotores de transcrição mitocondrial são necessários para a máxima trans-ativação pelos coativadores da família PGC-1 α , indicando que NRF-1 é também requerido para a biogênese mitocondrial e o PGC-1 α é implicado na regulação do genoma mitocondrial. Nos últimos anos, foi demonstrado que o PGC-1 α está localizado na mitocôndria, onde se co-localiza com o D-loop do DNAm_t e com o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) [204]. Além disso, AMPK α fosforila o PGC-1 α , que por sua vez se transloca à mitocôndria e forma um complexo com o Tfam. O Tfam, também reside nos compartimentos subcelulares à partir dos quais pode se translocar à mitocôndria em resposta ao exercício. Em conjunto, as evidências mostram que o exercício aumenta a translocação de ambos os fatores de transcrição à partir de seus compartimentos no citosol até a mitocôndria e, com isso, aumentam a biogênese mitocondrial [205, 206].

A transcrição de genes para a produção de ATP pela mitocôndria, bem como para as proteínas que consomem grande quantidades de ATP (por exemplo, SERCA2) é regulada coordenadamente pelo Tfam. Os níveis de Tfam reduzem tanto no núcleo da célula quanto nas mitocôndrias dos cardiomiócitos devido o aumento do estresse oxidativo [207]. No presente estudo foi encontrado que o Tfam está reduzido em ambas as subpopulações de mitocôndria (subsarcolemal e intermiofibrilar) no grupo Ovx. De fato, a redução na expressão do Tfam foi implicado na disfunção cardíaca [208].

A literatura fornece evidência à partir de estudos clínicos e experimentais, mostrando que o treinamento com exercícios melhora a sinalização redox, como um processo crítico relacionado à cardioproteção [113, 209]. No presente estudo, o exercício restaurou a expressão de enzimas antioxidantes em ambas as subpopulações e reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio. Os dados

funcionais deram sustentação a esse achado, mostrando a disfunção mitocondrial em animais com privação de hormônios, o que foi indicado pela redução na capacidade respiratória mitocondrial. Esta redução na fosforilação oxidativa pode ter ocorrido em função do acúmulo de produtos derivados da oxidação (proteínas carboniladas) no coração dos animais que passaram pela cirurgia de Ovx. A literatura reporta que o aumento cardíaco de produtos derivados da oxidação contribui efetivamente para a disfunção mitocondrial, uma vez que pode levar a um prejuízo na atividade dos complexos respiratórios I, III e V da CTE mitocondrial, bem como a um aumento na permeabilidade mitocondrial [210]. Esta evidência sugere uma associação entre a NOX-4 e disfunção mitocondrial [211], que foi restaurada pelo exercício. Mais experimentos são necessários para investigar a ligação entre a mitocôndria e NOX-4 após a privação de hormônios femininos.

Sob condições fisiológicas, a carga de Ca^{2+} para a mitocôndria serve como um sinal para aumentar o aporte energético, o que ocorre através da ativação das desidrogenases ou ATPase sintases [212]. Contudo, o aumento prolongado de Ca^{2+} citosólico pode deflagrar a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial, induzindo disfunção mitocondrial e apoptose de cardiomiócitos [213]. Nossos achados sugerem que as mitocôndrias de animais Ovx são mais expostas ao Ca^{2+} devido ao maior tempo para decaimento no transiente de Ca^{2+} , e, mesmo quando as mitocôndrias das ratas Ovx foram expostas a mesma concentração de Ca^{2+} , sua capacidade de retenção de Ca^{2+} foi menor antes da abertura do PTPM. Recentemente, nós mostramos que a privação de estrogênio reduz a capacidade de retenção do Ca^{2+} na mitocôndria [154]. No presente estudo, demonstramos que o exercício foi capaz de restaurar a capacidade de retenção de Ca^{2+} mitocondrial em ambas as subpopulações. Também observamos que a privação de estrogênio

aumentou a expressão de ciclofilina D, mas apenas na subpopulação intermiofibrilar. Lu et al. (2015) [214] reportaram que camundongos knockout para ciclofilina D tiveram formação aumentada de PTPM.

Neste estudo, detectamos maior expressão proteica de MCU em ambos os grupos submetidos ao protocolo de exercícios. Este resultado está de acordo com um achado recente, mostrando que estímulos fisiológicos aumentam a expressão de MCU no coração [215]. O aspecto de novidade é que o aumento de MCU foi observado apenas na subpopulação intermiofibrilar.

Assim, nossos dados sustentam a ideia de que o treinamento físico aeróbico de intensidade moderada previne a disfunção contrátil do miocárdio em ratas com privação hormonal por exercer importantes efeitos sobre a qualidade mitocondrial. Importante ressaltar que embora já estabelecido que mitocôndrias SSM exibem taxas mais baixas de fosforilação oxidativa em comparação as mitocôndrias IFM [45, 49], em nosso estudo observamos uma melhora em ambas subpopulações nos parâmetros envolvidos com a cinética do Ca^{2+} e respiração mitocondrial, mostrando que em ambas subpopulações o TF foi efetivo.

Há ainda questões a serem elucidadas neste estudo. Em primeiro lugar, não realizamos experimentos *in vivo* para determinar se a função mitocondrial está comprometida ou não em animais vivos. Além disso, experimentos *in vitro* com mitocôndrias isoladas podem não refletir condições “*in vivo*”. Em segundo lugar, animais Sham submetidos ao exercício apresentaram aumento do tempo de decaimento (T50) em cardiomiócitos isolados e redução da expressão da proteína superóxido dismutase mitocondrial na subpopulação mitocondrial isolada IFM.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o prejuízo no metabolismo energético e a perda da homeostase redox mitocondrial resultante da privação dos hormônios sexuais femininos, contribuem sobremaneira para a disfunção contrátil do miocárdio. Além disso, a fragmentação mitocondrial, aliada às modificações na forma e estrutura da organela, afetam a bioenergética celular, comprometendo o funcionamento da célula cardíaca. Dessa forma, podemos afirmar que o treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada utilizado atualmente como estratégia terapêutica não farmacológica na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares, previne a disfunção contrátil do miocárdio em ratas com privação de estrógenos por exercer importantes efeitos sobre a bioenergética mitocondrial. Desta forma, encontrar a maneira mais efetiva e segura de modular a função e a dinâmica mitocondrial nas doenças associadas à privação hormonal, representa um importante passo para o futuro das pesquisas no tratamento dessas doenças.

A figura 30 mostra o resumo dos principais achados do estudo.

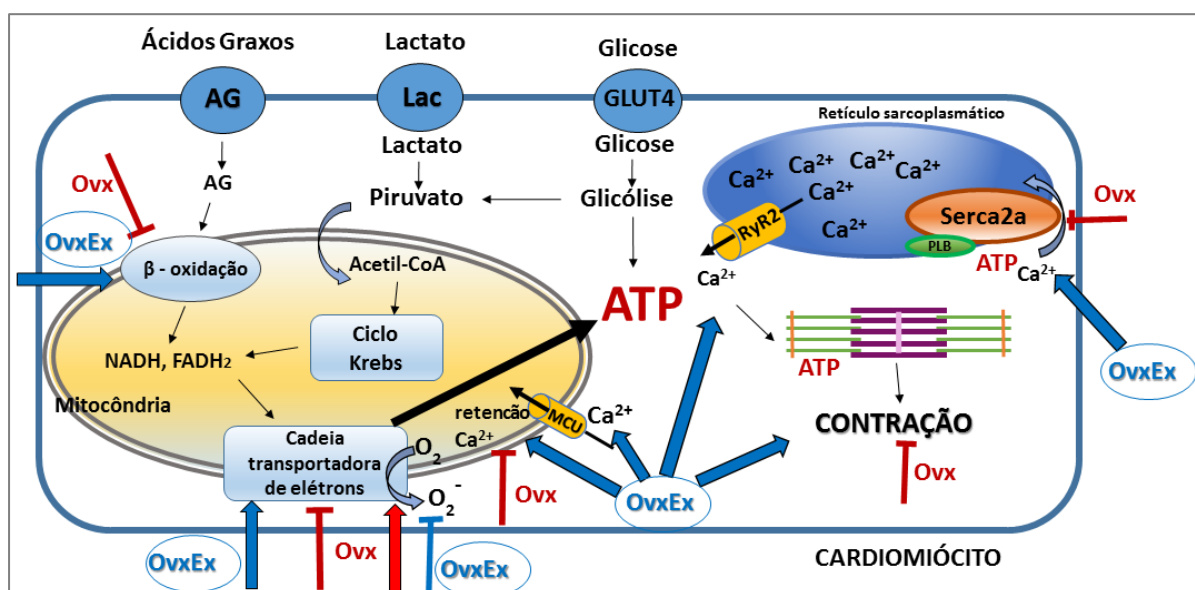


Figura 30. Resumo dos principais achados do estudo.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North Am* 2015;99:521-34.
- [2] Morabia A, Costanza MC. International variability in ages at menarche, first livebirth, and menopause. *World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. Am J Epidemiol* 1998;148:1195-205.
- [3] Speroff L. The perimenopause: definitions, demography, and physiology. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:397-410.
- [4] Burger HG. The menopausal transition. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1996;10:347-59.
- [5] Lobo RA, Davis SR, De Villiers TJ, Gompel A, Henderson VW, Hodis HN et al. Prevention of diseases after menopause. *Climacteric* 2014;17:540-56.
- [6] Polotsky HN, Polotsky AJ. Metabolic implications of menopause. *Semin Reprod Med* 2010;28:426-34.
- [7] Leonhardt SA, Edwards DP. Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227:969-80.
- [8] Kendall B, Eston R. Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. *Sports Med* 2002;32:103-23.
- [9] Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1143-58.
- [10] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.
- [11] dos Santos RL, da Silva FB, Ribeiro RF, Jr., Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;18:89-103.
- [12] Lindsey SH, da Silva AS, Silva MS, Chappell MC. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E113-E118.
- [13] Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 1993;17:263-5.
- [14] Mitterling KL, Spencer JL, Dziedzic N, Shenoy S, McCarthy K, Waters EM et al. Cellular and subcellular localization of estrogen and progestin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 2010;518:2729-43.
- [15] Irwin RW, Yao J, To J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J Neuroendocrinol* 2012;24:236-48.

- [16] Atsma F, Bartelink ML, Grobbee DE, van der Schouw YT. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. *Menopause* 2006;13:265-79.
- [17] Dosi R, Bhatt N, Shah P, Patell R. Cardiovascular disease and menopause. *J Clin Diagn Res* 2014;8:62-4.
- [18] Rosano GM, Vitale C, Marazzi G, Volterrani M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric* 2007;10 Suppl 1:19-24.
- [19] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2016;133:e38-360.
- [20] Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
- [21] White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 2002;38:73-80.
- [22] Khalil RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2013;86:1627-42.
- [23] Kang LS, Chen B, Reyes RA, Leblanc AJ, Teng B, Mustafa SJ et al. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H2105-H2115.
- [24] Pedersen LR, Frestad D, Michelsen MM, Mygind ND, Rasmussen H, Suhrs HE et al. Risk Factors for Myocardial Infarction in Women and Men: A Review of the Current Literature. *Curr Pharm Des* 2016;22:3835-52.
- [25] Piro M, Della BR, Abbate A, Biasucci LM, Crea F. Sex-related differences in myocardial remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1057-65.
- [26] Resanovic I, Rizzo M, Zafirovic S, Bjelogrljic P, Perovic M, Savic K et al. Anti-atherogenic effects of 17beta-estradiol. *Horm Metab Res* 2013;45:701-8.
- [27] Falkeborn M, Schairer C, Naessen T, Persson I. Risk of myocardial infarction after oophorectomy and hysterectomy. *J Clin Epidemiol* 2000;53:832-7.
- [28] Ribeiro RF, Jr., Pavan BM, Potratz FF, Fiorim J, Simoes MR, Dias FM et al. Myocardial contractile dysfunction induced by ovariectomy requires AT1 receptor activation in female rats. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:1-12.
- [29] Paigel AS, Ribeiro RF, Jr., Fernandes AA, Targueta GP, Vassallo DV, Stefanon I. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:54.
- [30] Davel AP, Jaffe IZ, Tostes RC, Jaisser F, Belin de Chantemele EJ. New roles of aldosterone and mineralocorticoid receptors in cardiovascular disease: translational and sex-specific effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018;315:H989-H999.

- [31] Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LM. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension* 2005;46:426-32.
- [32] Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:15-22.
- [33] Bupha-Intr T, Wattanapermpool J. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1101-H1108.
- [34] Wattanapermpool J, Reiser PJ. Differential effects of ovariectomy on calcium activation of cardiac and soleus myofilaments. *Am J Physiol* 1999;277:H467-H473.
- [35] Turdi S, Huff AF, Pang J, He EY, Chen X, Wang S et al. 17-beta estradiol attenuates ovariectomy-induced changes in cardiomyocyte contractile function via activation of AMP-activated protein kinase. *Toxicol Lett* 2015;232:253-62.
- [36] Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995;17:125S-33S.
- [37] Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34:1079-86.
- [38] Shiguemoto GE, Prestes J, Leite RD, Pereira GB, Pontes CL, D'Avila FV et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. *Scand J Med Sci Sports* 2012;22:607-17.
- [39] Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci* 2006;7:74.
- [40] Hepple RT. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. *Front Aging Neurosci* 2014;6:211.
- [41] Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res* 2012;110:1109-24.
- [42] Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 2010;123:2533-42.
- [43] Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira HC, Castilho RF. Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci* 2006;11:2554-64.
- [44] Colom B, Oliver J, Roca P, Garcia-Palmer FJ. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage. *Cardiovasc Res* 2007;74:456-65.

- [45] Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* 1977;252:8731-9.
- [46] Hollander JM, Thapa D, Shepherd DL. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307:H1-14.
- [47] Lukyanenko V, Chikando A, Lederer WJ. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1957-71.
- [48] Kavazis AN, Alvarez S, Talbert E, Lee Y, Powers SK. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H144-H152.
- [49] Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H868-H872.
- [50] Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 1967;213:137-9.
- [51] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- [52] Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 1990;122:1-63.
- [53] Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 1997;90:121-9.
- [54] Frederick RL, Shaw JM. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 2007;8:1668-75.
- [55] Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;89:799-845.
- [56] Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010;121:2012-22.
- [57] Carlucci A, Lignitto L, Feliciello A. Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol* 2008;18:604-13.
- [58] Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 2001;26:23-9.
- [59] Palaniyandi SS, Qi X, Yogalingam G, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010;7:e95-e102.
- [60] James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 2003;278:36373-9.

- [61] Barth E, Stammer G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:669-81.
- [62] Ong SB, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012;94:190-6.
- [63] Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the human heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41:99-106.
- [64] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005;85:1093-129.
- [65] Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 2003;546:355-8.
- [66] Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* (1985) 1995;79:675-86.
- [67] Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998;1363:100-24.
- [68] Friguet B, Bulteau AL, Petropoulos I. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnol J* 2008;3:757-64.
- [69] Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:347-66.
- [70] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47:333-43.
- [71] Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42:346-54.
- [72] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
- [73] Claudio ER, Almeida SA, Mengal V, Brasil GA, Santuzzi CH, Tiradentes RV et al. Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2017;50:e5495.
- [74] O'Rourke B. Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol* 2007;69:19-49.
- [75] Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005;309:481-4.
- [76] Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De SD, Leo S, Wieckowski MR et al. Mitochondrial dynamics and Ca²⁺ signaling. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:442-9.
- [77] Gomez L, Li B, Mewton N, Sanchez I, Piot C, Elbaz M et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc Res* 2009;83:226-33.

- [78] Javadov S, Hunter JC, Barreto-Torres G, Parodi-Rullan R. Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion versus carcinogenesis. *Cell Physiol Biochem* 2011;27:179-90.
- [79] Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 2006;281:33789-801.
- [80] Rosca MG, Hoppel CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41:107-12.
- [81] Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2008;80:30-9.
- [82] Hausenloy DJ, Ruiz-Meana M. Not just the powerhouse of the cell: emerging roles for mitochondria in the heart. *Cardiovasc Res* 2010;88:5-6.
- [83] Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005;1:361-70.
- [84] Silveira LR, Pilegaard H, Kusuhashi K, Curi R, Hellsten Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:969-76.
- [85] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006;127:397-408.
- [86] Piantadosi CA, Suliman HB. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem* 2006;281:324-33.
- [87] Vina J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:1369-74.
- [88] Choi YS, Kim S, Pak YK. Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;54 Suppl 2:S3-S9.
- [89] Medeiros DM. Assessing mitochondria biogenesis. *Methods* 2008;46:288-94.
- [90] Hood DA. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34:465-72.
- [91] Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* 2009;61:131-8.
- [92] Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003;299:896-9.
- [93] Nisoli E, Cozzi V, Carruba MO. Amino acids and mitochondrial biogenesis. *Am J Cardiol* 2008;101:22E-5E.

- [94] Gottlieb RA, Gustafsson AB. Mitochondrial turnover in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:1295-301.
- [95] Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics* 2007;29:246-52.
- [96] Oliveira RS, Ferreira JC, Gomes ER, Paixao NA, Rolim NP, Medeiros A et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J Physiol* 2009;587:3899-910.
- [97] Antunes-Correa LM, Kanamura BY, Melo RC, Nobre TS, Ueno LM, Franco FG et al. Exercise training improves neurovascular control and functional capacity in heart failure patients regardless of age. *Eur J Prev Cardiol* 2012;19:822-9.
- [98] Sun B, Wang JH, Lv YY, Zhu SS, Yang J, Ma JZ. Proteomic adaptation to chronic high intensity swimming training in the rat heart. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2008;3:108-17.
- [99] Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2011;43:1334-59.
- [100] Campbell PT, Gross MD, Potter JD, Schmitz KH, Duggan C, McTiernan A et al. Effect of exercise on oxidative stress: a 12-month randomized, controlled trial. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42:1448-53.
- [101] Pialoux V, Brown AD, Leigh R, Friedenreich CM, Poulin MJ. Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women. *Hypertension* 2009;54:1014-20.
- [102] Aschar-Sobbi R, Izaddoustdar F, Korogyi AS, Wang Q, Farman GP, Yang F et al. Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF α . *Nat Commun* 2015;6:6018.
- [103] Starnes JW, Barnes BD, Olsen ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. *J Appl Physiol* (1985) 2007;102:1793-8.
- [104] Burelle Y, Wambolt RB, Grist M, Parsons HL, Chow JC, Antler C et al. Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1055-H1063.
- [105] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H et al. Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* 2003;26:829-37.
- [106] Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004;18:1150-2.
- [107] Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med* 2008;44:224-9.

- [108] Judge S, Jang YM, Smith A, Selman C, Phillips T, Speakman JR et al. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1564-R1572.
- [109] Terjung RL, Baldwin KM, Mole PA, Klinkerfuss GH, Holloszy JO. Effect of running to exhaustion on skeletal muscle mitochondria: a biochemical study. *Am J Physiol* 1972;223:549-54.
- [110] Brooks GA, Hittelman KJ, Faulkner JA, Beyer RE. Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt. *Am J Physiol* 1971;220:1053-9.
- [111] Dohm GL, Huston RL, Askew EW, Weiser PC. Effects of exercise on activity of heart and muscle mitochondria. *Am J Physiol* 1972;223:783-7.
- [112] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
- [113] Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Bello-Klein A et al. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2008;21:1188-93.
- [114] Xu X, Zhao W, Wan W, Ji LL, Powers AS, Erikson JM et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade reduces oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Exp Physiol* 2010;95:1008-15.
- [115] Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJ, Flues K, Bertagnolli M, Moreira ED et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 2005;46:998-1003.
- [116] da Palma RK, Moraes-Silva IC, da Silva DD, Shimojo GL, Conti FF, Bernardes N et al. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *J Appl Physiol* (1985) 2016;121:1032-8.
- [117] Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Parmelee DJ, Fiebig R, Ji LL. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiol Scand* 1997;160:139-48.
- [118] Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13807-12.
- [119] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C817-C833.
- [120] Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H722-H731.
- [121] Stuewe SR, Gwirtz PA, Agarwal N, Mallet RT. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:903-13.

- [122] Ascensao A, Ferreira R, Magalhaes J. Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 2007;117:16-30.
- [123] Li L, Muhlfeld C, Niemann B, Pan R, Li R, Hilfiker-Kleiner D et al. Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. *Basic Res Cardiol* 2011;106:1221-34.
- [124] Ljubicic V, Joseph AM, Saleem A, Uguccioni G, Collu-Marchese M, Lai RY et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:223-34.
- [125] Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* 2008;87:142-9.
- [126] Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2001;90:1137-57.
- [127] Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1340-E1346.
- [128] Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005;1:15-25.
- [129] Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 2007;282:194-9.
- [130] Chow LS, Greenlund LJ, Asmann YW, Short KR, McCrady SK, Levine JA et al. Impact of endurance training on murine spontaneous activity, muscle mitochondrial DNA abundance, gene transcripts, and function. *J Appl Physiol* (1985) 2007;102:1078-89.
- [131] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003;24:78-90.
- [132] Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* 2006;209:2265-75.
- [133] Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12017-22.
- [134] Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 1998;12:2499-509.
- [135] Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J et al. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J Clin Invest* 2007;117:2459-67.

- [136] Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002;418:797-801.
- [137] Coleman R, Weiss A, Finkelbrand S, Silbermann M. Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice. *Acta Histochem* 1988;83:81-90.
- [138] Kemi OJ, Hoydal MA, Haram PM, Garnier A, Fortin D, Ventura-Clapier R et al. Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. *Cardiovasc Res* 2007;76:91-9.
- [139] Terblanche SE, Gohil K, Packer L, Henderson S, Brooks GA. The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;128:889-96.
- [140] Matlib MA, Rembert JC, Millard RW, Ashraf M, Rouslin W, Asano G et al. Mitochondrial function in canine experimental cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1983;15:221-32.
- [141] Watson PA, Reusch JE, McCune SA, Leinwand LA, Luckey SW, Konhilas JP et al. Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H246-H259.
- [142] Strom CC, Aplin M, Ploug T, Christoffersen TE, Langfort J, Viese M et al. Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy. *FEBS J* 2005;272:2684-95.
- [143] Eisele JC, Schaefer IM, Randel NJ, Post H, Liebetanz D, Bruel A et al. Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle. *Basic Res Cardiol* 2008;103:12-21.
- [144] Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. *Cardiovasc Res* 2013;99:55-64.
- [145] Budiono BP, See Hoe LE, Peart JN, Sabapathy S, Ashton KJ, Haseler LJ et al. Voluntary running in mice beneficially modulates myocardial ischemic tolerance, signaling kinases, and gene expression patterns. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;302:R1091-R1100.
- [146] Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:459-66.
- [147] Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M et al. Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab* 2007;5:345-56.
- [148] Vitale C, Mendelsohn ME, Rosano GM. Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:532-42.
- [149] Vaartjes I, O'Flaherty M, Grobbee DE, Bots ML, Capewell S. Coronary heart disease mortality trends in the Netherlands 1972-2007. *Heart* 2011;97:569-73.
- [150] Mosca L, Barrett-Connor E, Wenger NK. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation* 2011;124:2145-54.

- [151] Wattanapermpool J, Riabroy T, Preawnim S. Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. *Life Sci* 2000;66:533-43.
- [152] Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:207-58.
- [153] Ribeiro RF, Jr., Ronconi KS, Morra EA, Do Val Lima PR, Porto ML, Vassallo DV et al. Sex differences in the regulation of spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations. *Mol Cell Biochem* 2016;419:41-51.
- [154] Ribeiro Junior RF, Rodrigues PL, Morra EA, Ronconi KS, Do Val Lima PR, Porto ML et al. Estrogen regulates spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations. *Mitochondrion* 2017;35:87-96.
- [155] Rattanasopa C, Phungphong S, Wattanapermpool J, Bupha-Intr T. Significant role of estrogen in maintaining cardiac mitochondrial functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;147:1-9.
- [156] Pavon N, Cabrera-Orefice A, Gallardo-Perez JC, Uribe-Alvarez C, Rivero-Segura NA, Vazquez-Martinez ER et al. In female rat heart mitochondria, oophorectomy results in loss of oxidative phosphorylation. *J Endocrinol* 2017;232:221-35.
- [157] Ribeiro Junior RF, Dabkowski ER, Shekar KC, KA OC, Hecker PA, Murphy MP. MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload. *Free Radic Biol Med* 2018;117:18-29.
- [158] Chen K, Keaney JF, Jr. Evolving concepts of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2012;14:476-83.
- [159] Dias FM, Ribeiro RF, Jr., Fernandes AA, Fiorim J, Travaglia TC, Vassallo DV et al. Na⁺K⁺-ATPase activity and K⁺ channels differently contribute to vascular relaxation in male and female rats. *PLoS One* 2014;9:e106345.
- [160] Ribeiro RF, Jr., Potratz FF, Pavan BM, Forechi L, Lima FL, Fiorim J et al. Carvedilol prevents ovariectomy-induced myocardial contractile dysfunction in female rat. *PLoS One* 2013;8:e53226.
- [161] Levine BD. Can intensive exercise harm the heart? The benefits of competitive endurance training for cardiovascular structure and function. *Circulation* 2014;130:987-91.
- [162] Campos JC, Queliconi BB, Dourado PM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LR et al. Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. *PLoS One* 2012;7:e52764.
- [163] Campos JC, Gomes KM, Ferreira JC. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol* 2013;62:107-19.
- [164] Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol* 2013;57:119-28.

- [165] Ribeiro RF, Jr., Dabkowski ER, O'Connell KA, Xu W, Galvao TF, Hecker PA et al. Effect of a high-protein diet on development of heart failure in response to pressure overload. *Appl Physiol Nutr Metab* 2014;39:238-47.
- [166] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- [167] Guatimosim S, Sobie EA, dos Santos CJ, Martin LA, Lederer WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1327-C1339.
- [168] Batandier C, Guigas B, Demaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* 2006;38:33-42.
- [169] Antony JM, van MG, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 2004;7:1088-95.
- [170] Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon- labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 1988;82:2017-25.
- [171] Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 1997;33:243-57.
- [172] Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Gruenke LD, Craig JC. Dual carbon-labeled isotope experiments using D-[6-14C] glucose and L- [1,2,3-13C3] lactate: a new approach for investigating human myocardial metabolism during ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1985;5:1138-46.
- [173] Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Gruenke LD, Morris DL, Craig JC. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. *J Clin Invest* 1985;76:1819-27.
- [174] Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA, Gertz EW. Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. *J Clin Invest* 1990;85:1648-56.
- [175] Eisner DA, Choi HS, Diaz ME, O'Neill SC, Trafford AW. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res* 2000;87:1087-94.
- [176] Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:951-69.
- [177] Tu JV, Nardi L, Fang J, Liu J, Khalid L, Johansen H. National trends in rates of death and hospital admissions related to acute myocardial infarction, heart failure and stroke, 1994-2004. *CMAJ* 2009;180:E118-E125.
- [178] Milcent C, Dormont B, Durand-Zaleski I, Steg PG. Gender differences in hospital mortality and use of percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: microsimulation analysis of the 1999 nationwide French hospitals database. *Circulation* 2007;115:833-9.

- [179] Perez-Lopez FR, Chedraui P, Gilbert JJ, Perez-Roncero G. Cardiovascular risk in menopausal women and prevalent related co-morbid conditions: facing the post-Women's Health Initiative era. *Fertil Steril* 2009;92:1171-86.
- [180] Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res* 2005;66:295-306.
- [181] Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2017;14:238-50.
- [182] Benito B, Nattel S. Exercise training as a treatment for heart failure: potential mechanisms and clinical implications. *J Physiol* 2009;587:5011-3.
- [183] Pina IL, Daoud S. Exercise and heart failure. *Minerva Cardioangiol* 2004;52:537-46.
- [184] Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR, Jr., Alba-Loureiro TC et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol* (1985) 2009;106:1631-40.
- [185] Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol* 2002;541:863-75.
- [186] Fenning A, Harrison G, Dwyer D, Rose'Meyer R, Brown L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cell Biochem* 2003;251:51-9.
- [187] Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF, Tucci PJ. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol* 2010;109:909-14.
- [188] Carneiro-Junior MA, Peluzio MC, Silva CH, Amorim PR, Silva KA, Souza MO et al. Exercise training and detraining modify the morphological and mechanical properties of single cardiac myocytes obtained from spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:1042-6.
- [189] Pighon A, Paquette A, Barsalani R, Chapados NA, Rabasa-Lhoret R, Yasari S et al. Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats. *Maturitas* 2009;64:52-7.
- [190] Claudio ER, Endlich PW, Santos RL, Moyses MR, Bissoli NS, Gouvea SA et al. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS One* 2014;8:e64806.
- [191] Endlich PW, Claudio ER, da Silva Goncalves WL, Gouvea SA, Moyses MR, de Abreu GR. Swimming training prevents fat deposition and decreases angiotensin II-induced coronary vasoconstriction in ovariectomized rats. *Peptides* 2013;47:29-35.
- [192] Ben AS, Belfki-Benali H, Ahmed DB, Haddad N, Jmal A, Abdennebi M et al. Postmenopausal hypertension, abdominal obesity, apolipoprotein and insulin resistance. *Clin Exp Hypertens* 2016;38:370-4.

- [193] Shea KL, Gavin KM, Melanson EL, Gibbons E, Stavros A, Wolfe P et al. Body composition and bone mineral density after ovarian hormone suppression with or without estradiol treatment. *Menopause* 2015;22:1045-52.
- [194] Conley KE. Mitochondria to motion: optimizing oxidative phosphorylation to improve exercise performance. *J Exp Biol* 2016;219:243-9.
- [195] Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:114-22.
- [196] Lee Y, Kwak HB, Hord J, Kim JH, Lawler JM. Exercise training attenuates age-dependent elevation of angiotensin II type 1 receptor and Nox2 signaling in the rat heart. *Exp Gerontol* 2015;70:163-73.
- [197] Roman-Campos D, Carneiro-Junior MA, Primola-Gomes TN, Silva KA, Quintao-Junior JF, Gondim AN et al. Chronic exercise partially restores the transmural heterogeneity of action potential duration in left ventricular myocytes of spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:155-7.
- [198] Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 2001;50:495-508.
- [199] Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U et al. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 2005;67:161-72.
- [200] Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:354-61.
- [201] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-205.
- [202] Bupha-Intr T, Laosiripisan J, Wattanapermpool J. Moderate intensity of regular exercise improves cardiac SR Ca²⁺ uptake activity in ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 2009;107:1105-12.
- [203] Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF, Stanley WC et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011.
- [204] Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, Ciriolo MR. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 2010;285:21590-9.
- [205] Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise increases mitochondrial PGC-1{alpha} content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 2011.

- [206] Smith BK, Mukai K, Lally JS, Maher AC, Gurd BJ, Heigenhauser GJ et al. AMP-activated protein kinase is required for exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor co-activator 1 translocation to subsarcolemmal mitochondria in skeletal muscle. *J Physiol* 2013;591:1551-61.
- [207] Watanabe A, Arai M, Koitabashi N, Niwano K, Ohyama Y, Yamada Y et al. Mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M regulate Serca2 gene transcription. *Cardiovasc Res* 2011;90:57-67.
- [208] Zhang D, Li Y, Heims-Waldron D, Bezzerides V, Guatimosim S, Guo Y et al. Mitochondrial Cardiomyopathy Caused by Elevated Reactive Oxygen Species and Impaired Cardiomyocyte Proliferation. *Circ Res* 2018;122:74-87.
- [209] Adams V, Linke A, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Mobius-Winkler S et al. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:555-62.
- [210] Anderson EJ, Katunga LA, Willis MS. Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:179-93.
- [211] Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 2010;106:1253-64.
- [212] Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* 2012;51:2959-73.
- [213] Kwong JQ, Molkenin JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab* 2015;21:206-14.
- [214] Lu X, Kwong J, Molkenin JD, Bers DM. Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings. *Circ Res* 2015.
- [215] Zaglia T, Ceriotti P, Campo A, Borile G, Armani A, Carullo P et al. Content of mitochondrial calcium uniporter (MCU) in cardiomyocytes is regulated by microRNA-1 in physiologic and pathologic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E9006-E9015.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **030/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre as propriedades contráteis e moleculares de cardiomiócitos isolados de ratas ovariectomizadas."** que tem como responsável o (a) docente **Ivanita Stefanon**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 05/09/14.



Vitória (ES), 05 de setembro de 2014.

Endurance training restores spatially distinct cardiac mitochondrial function and myocardial contractility in ovariectomized rats.

Morra EA¹, Rodrigues PL¹, Jesus ICG², Do Val Lima PR¹, Ávila RA¹, Zanardo TÊC³, Nogueira BV³, Bers DM⁴, Guatimosim S², Stefanon I¹, Ribeiro Júnior RF⁵.

✉ Author information

Abstract

We previously demonstrated that the loss of female hormones induces cardiac and mitochondrial dysfunction in the female heart. Here, we show the impact of endurance training for twelve weeks, a nonpharmacological therapy against cardiovascular disease caused by ovariectomy and its contribution to cardiac contractility, mitochondrial quality control, bioenergetics and oxidative damage. We found that ovariectomy induced cardiac hypertrophy and dysfunction by decreasing SERCA2 and increasing phospholamban protein expression. Endurance training restored myocardial contractility, SERCA2 levels, increased calcium transient in ovariectomized rats but did not change phospholamban protein expression or cardiac hypertrophy. Additionally, ovariectomy decreased the amount of intermyofibrillar mitochondria and induced mitochondrial fragmentation that were accompanied by decreased levels of mitofusin 1, PGC-1 α , NRF-1, total AMPK- α and mitochondrial Tfam. Endurance training prevented all these features except for mitofusin 1. Ovariectomy reduced O₂ consumption, elevated O₂⁻ release and increased Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in both mitochondrial subpopulations. Ovariectomy also increased NOX-4 protein expression in the heart, reduced mitochondrial Mn-SOD, catalase protein expression and increased protein carbonylation in both mitochondrial subpopulations, which were prevented by endurance training. Taken together, our findings show that endurance training prevented cardiac contractile dysfunction and mitochondrial quality control in ovariectomized rats.

KEYWORDS: Bioenergetics; Cardiac dysfunction; Endurance training; Female hormone deprivation; Intermyofibrillar and subsarcolemmal mitochondria; Mitochondrial quality control

PMID: 30315935 DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.406](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.406)

Format: Abstract +

Full text links



Mitochondrion, 2017 Jul;35:87-98. doi: 10.1016/j.mito.2017.05.011. Epub 2017 May 29.

Estrogen regulates spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations.

Ribeiro Junior RE¹, Rodrigues PL², Morra EA², Ronconi KS², De Val Lima PB², Porto ML², Simões MR², Vassallo DV², Figueiredo SG², Stefanon I².

Ⓜ Author information

Abstract

Increased susceptibility to permeability transition pore (mPTP) is a significant concern to decreased cardiac performance in postmenopausal females. The goal of this study was to assess the effects of estrogen deficiency on the two spatially distinct mitochondrial subpopulations from left ventricle: subsarcolemmal mitochondria (SSM) and intermyofibrillar mitochondria (IFM) based on: morphology, membrane potential, oxidative phosphorylation, mPTP and reactive oxygen species production. Female rats (8weeks old) that underwent bilateral ovariectomy were randomly assigned to receive daily treatment with placebo (OVX), estrogen replacement (OVX+E2) and Sham for 60days. The yield for IFM was found higher in the OVX group and lower in the SSM. SSM internal complexity and size were higher in the OVX group, although membrane potential was not different. The maximal rate of mitochondrial respiration, states 3 and 4, using glutamate+malate as substrate, were higher in IFM and SSM from the OVX group. The respiratory control ratio (RCR - state3/state 4), was not different in both SSM and IFM with glutamate+malate. The ADP/O ratio was found lower in IFM and SSM from OVX compared to Sham. When pyruvate was used, state 3 was found unchanged in both IFM and SSM, state 4 was greater in IFM from OVX rats compared to Sham and the ADP/O ratio was decreased. The RCR was unchanged in both subpopulations. The IFM from OVX rats presented a lower Ca^{2+} retention capacity compared to Sham, however, the SSM remained unchanged. Hydrogen peroxide formation was found increased in the IFM from OVX animals with glutamate+malate and rotenone+succinate as substrates. The SSM showed increased ROS production only with rotenone+succinate. Western blot analyzes showed decreased levels of PGC-1 α and NRF-1 in the OVX group. Estrogen replacement was able to restore most of the alterations induced by ovariectomy. In conclusion, our data shows that estrogen deficiency has distinct effects on the two spatially distinct mitochondrial subpopulations in oxidative phosphorylation, morphology, calcium retention capacity and ROS production.

KEYWORDS: Estrogen; Heart; Intermyofibrillar mitochondria; Subsarcolemmal mitochondria; mPTP

PMID: 28572055 DOI: [10.1016/j.mito.2017.05.011](https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.05.011)

[Indexed for MEDLINE]

Format: Abstract ▾

Full text links



Mol Cell Biochem. 2016 Aug;419(1-2):41-51. doi: 10.1007/s11010-016-2748-4. Epub 2016 Jul 2.

Sex differences in the regulation of spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations.

Ribeiro RE Jr¹, Ronconi KS², Morra EA², Do Val Lima PR², Porto ML², Vassallo DV², Figueiredo SG², Stefanon J².

Ⓜ Author information

Abstract

Spatially distinct mitochondrial subpopulation may mediate myocardial pathology through permeability transition pore opening (MPTP). The goal of this study was to assess sex differences on the two spatially distinct mitochondrial subpopulations: subsarcolemmal mitochondria (SSM) and intermyofibrillar mitochondria (IFM) based on morphology, membrane potential, mitochondrial function, oxidative phosphorylation, and MPTP. Aged matched Wistar rats were used to study SSM and IFM. Mitochondrial size was larger in SSM than in IFM in both genders. However, SSM internal complexity, yield, and membrane potential were higher in male than in female. The maximal rate of mitochondrial respiration, states 3 and 4, using glutamate + malate as substrate, were higher in IFM and SSM in the male group compared to female. The respiratory control ratio (RCR-state3/state 4), was not different in both SSM and IFM with glutamate + malate. The ADP:O ratio was found higher in IFM and SSM from female compared to males. When pyruvate was used, state 3 was found unchanged in both IFM and SSM, state 4 was also greater in male IFM compared to female. The RCR increased in the SSM while IFM remained the same. State 4 was higher in male SSM while in the IFM remained the same. The IFM presented a higher Ca(2+) retention capacity compared with SSM, however, there was a greater sensitivity to Ca(2+)-induced MPTP in SSM and IFM in the male group compared to female. In conclusion, our data show that spatially distinct mitochondrial subpopulations have sex-based differences in oxidative phosphorylation, morphology, and calcium retention capacity.

KEYWORDS: Heart; Mitochondria; Mitochondrial subpopulations; Sex differences

PMID: 27370644 DOI: [10.1007/s11010-016-2748-4](https://doi.org/10.1007/s11010-016-2748-4)

[Indexed for MEDLINE]

Format: Abstract ▾

Full text links

Can J Physiol Pharmacol. 2014 Jun;92(6):476-80. doi: 10.1139/cjpp-2014-0042. Epub 2014 Apr 26.

NRC full text article
Research Press

Heart rate at 4 s after the onset of exercise in endurance-trained men.

Zaniqueli D¹, Morra EA, Dantas EM, Baldo MP, Carletti L, Perez AJ, Rodrigues SL, Mill JG.

⊕ Author information

Abstract

It has been suggested that the increase in heart rate (HR) at the onset of exercise is caused by vagal withdrawal. In fact, endurance runners show a lower HR in maximum aerobic tests. However, it is still unknown whether endurance runners have a lower HR at 4 s after the onset of exercise (4th-sec-HR). We sought to measure the HR at the onset of the 4 s exercise test (4-sET), clarifying its relationship to heart rate variability (HRV), spectral indices, and cardiac vagal index (CVI) in endurance runners (ER) and healthy untrained controls (CON). HR at 4th-sec-HR, CVI, and percent HR increase during exercise were analyzed in the 4-sET. High frequency spectrum (HF-nu), low frequency spectrum (LF-nu), and low frequency/high frequency band ratio (LF/HF) were analyzed from the HRV. ER showed a significantly higher HF, and both a lower LF and LF/HF ratio compared with the CON. ER presented a significantly lower 4th-sec-HR, although neither CVI nor HR increases during exercise were statistically different from the CON. In conclusion, ER presented a lower 4th-sec-HR secondary to increased vagal influence over the sinus node. CVI seems to be too weak to use for discriminating individuals with respect to the magnitude of HR vagal control.

KEYWORDS: 4 s exercise test; coureurs de fond; endurance runners; exercice physique; heart rate; heart rate variability; physical exercise; retrait vagal; rythme cardiaque; test de l'exercice de 4 secondes; vagal withdrawal; variabilité du rythme cardiaque

PMID: 24886303 DOI: 10.1139/cjpp-2014-0042